

**ELEKTROPHORETISCHE UND CHROMATOGRAPHISCHE
PRÄPARATION VON ISOFERRITINEN AUS
HUMANEM HERZ - UND LEBERGEWEBE ZUR
IMMUNOLOGISCHEN DIFFERENZIERUNG
UND BESTIMMUNG VON SAUREM ISOFERRITIN
IM SERUM**

DORIS JÄGER

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555413_0003

Aus der Medizinischen Klinik II
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. G. Paumgartner

ELEKTROPHORETISCHE UND CHROMATOGRAPHISCHE PRAPARATION VON
ISOERRITINEN AUS HUMANEM HERZ- UND LEBERGEWEBE ZUR
IMMUNOLOGISCHEN DIFFERENZIERUNG UND BESTIMMUNG VON SAUREM
ISOERRITIN IM SERUM

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Doris Jäger

aus

Ingolstadt

1988

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. R. Lamerz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. Paumgartner

Prof. Dr. E.-P. Rieber

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.04.1988

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1.	E I N L E I T U N G	1
2.	H A U P T T E I L	3
2.1.	FREMDUNTERSUCHUNGEN ÜBER FERRITIN	3
2.1.1.	Struktur des Ferritins	3
2.1.2.	Physikalisch-chemische Eigenschaften	7
2.1.3.	Eisenmetabolismus	9
2.1.4.	Immunologische Eigenschaften der Isoferritine	11
2.1.5.	Ferritinmetabolismus: Synthese, Regulation und Abbau	14
2.1.6.	Vorkommen und physiologische Bedeutung der Isoferritine	17
2.1.7.	Ätiologie pathologisch veränderter Ferritine in Geweben, im Serum und auf Zelloberflächen	20
2.1.8.	Ferritinisolierung	43
2.1.9.	Quantitative Ferritinbestimmung	45
2.2.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	49
2.2.1.	METHODIK	49
2.2.1.1.	Analytische Verfahren	49
	Gesamteiweißbestimmung	49
	Zweidimensionale Doppeldiffusion (Ouchterlony)	50
	Qualitative Elektrophorese in Polyacrylamid- und ultradünnen Agarosegelen	50

Qualitative Isoelektrofokussierung in Polyacrylamid- und ultradünnen Agarosegelen	52
Radioimmunoassay	53
Markierung und Reinigung des markierten Antigens	53
Testung des ersten Antikörpers (Antikörperverdünnungsreihe)	55
Testansatz mit polyklonalem Antikörper	57
Testansatz mit monoklonalem Antikörper	59
2.2.1.2. Präparative Verfahren	60
Gewebeextraktion (Herz und Leber)	60
Säulenchromatographie	61
Gelfiltration	61
DEAE-Anionenaustauschchromatographie	62
Affinitätschromatographie	63
Protein-A-Chromatographie	65
Präparative Flachbett-Isoelektrofokussierung	65
Zentrifugation	67
Konzentrierung	68
Lagerung	68
2.2.1.3. Herstellung von Antiseren	69
Immunisierung	69
Absorption und Reinigung	70
Immunad/-desorption	70
2.2.1.4. Berechnungen	71
Markierung	71
Antikörperverdünnungsreihe und RIA	72
Statistische Berechnungen	73
2.2.2. MATERIALIEN UND PATIENTENGUT	73
2.2.2.1. Materialien	73
Extrahierte Gewebe	73
Standardproteine	74
Tracer	75
Antiseren	75
2.2.2.2. Patientengut	76
Normalkollektiv	76
Patienten mit malignen Erkrankungen	76
Patienten mit nichtmalignen Erkrankungen	76

2.2.3.	EIGENE ERGEBNISSE	77
2.2.3.1.	Methodischer Teil	77
	Gewealsextraktion	77
	Reinigung des Antigens	78
	Herstellung von Antiseren	111
	Immunad/-desorptionsstudien	111
	Radioimmunoassay	113
	Markierung und Reinigung des markierten Antigens	113
	Antikörperverdünnungskurven	125
	Standardkurven	126
	Haltbarkeit	136
2.2.3.2.	Serumbestimmungen bei Normalpersonen und Patienten	141
	Saures Ferritin	141
	Gesamtferritin	142
	CEA	144
2.2.4.	DISKUSSION	152
2.2.4.1.	Methodischer Teil	152
	Gewealsextraktion und Reinigung des Antigens	152
	Herstellung von Antiseren	156
	Immunad/-desorptionsstudien	157
	Radioimmunoassay	160
	Markierung und Reinigung des markierten Antigens	160
	Antikörperverdünnungskurven	162
	Standardinhibitionskurven und Testansatz	164
2.2.4.2	Bestimmung von saurem Ferritin, Gesamtferritin und CEA bei Normalpersonen und Patienten	168
3.	Z U S A M M E N F A S S U N G	174
4.	L I T E R A T U R -	178
	V E R Z E I C H N I S	

1. E I N L E I T U N G

Das Eisenspeicherprotein Ferritin spielt aufgrund seiner schnell verfügbaren Eisenreserven und der Entgiftung freien ionisierten Eisens eine zentrale Rolle im Eisenmetabolismus der eukaryontischen Zelle (110).

Das Serumferritin des Menschen, das üblicherweise mit Immunoassays, basierend auf Leber- oder Milzferritin, gemessen wird, hat wegen seiner engen Korrelation mit dem Gesamtkörper-eisen (25, 253) in der Diagnostik und Therapieüberwachung von Eisenstoffwechselstörungen eine große klinische Bedeutung erlangt (49, 22, 290).

Das Protein tritt jedoch in vielen verschiedenen Formen mit charakteristischer Gewebsverteilung auf (271, 13): Die alkalischen "Isoferritine" überwiegen in Milz, Leber und allen Geweben bei Eisenüberladung, die sauren Isoferritine in Herz, Hela-Zellen, foetalen Geweben und in vielen Tumorgeweben (91, 9, 40, 198, 282). Die strukturellen Unterschiede der Ferritine entstehen vor allem durch die variablen Anteile der beiden immunologisch unterscheidbaren Untereinheiten (H- und L-Ketten) am Aufbau des 24-Untereinheiten-Proteins (15).

Nach der Entdeckung dieser sauren Isoferritine im Serum von Tumorpatienten (126, 127) begannen einige Labors spezifische Immunoassays für saure Ferritine zu entwickeln, da man sich vom sauren Ferritin nun spezifischere Aussagen über Tumorleidenden als durch die Bestimmung des Gesamtferritins erhoffte. Die Ergebnisse ihrer Messungen bei verschiedenen malignen und nichtmalignen Erkrankungen waren allerdings sehr widersprüchlich (126, 160, 16, 55, 220) und reichten von einigen wenigen

bis einigen tausend Nanogramm pro Milliliter. Die Ursache dafür liegt in erster Linie in der unterschiedlichen Spezifität der verwendeten Antikörper, bedingt durch die hohe Kreuzreaktivität zwischen sauren und alkalischen Ferritinen.

Neben einer ausführlichen Übersicht über die physikochemischen Eigenschaften und die physiologische und klinische Bedeutung von alkalischen und sauren Ferritinen waren die Ziele der vorliegenden Arbeit:

- 1) Die schonende Präparation und Gewinnung hochgereinigten Ferritins aus humanem Herz- und Lebergewebe;
- 2) die quantitative Auftrennung der gereinigten Gewebsferritine in ihre Isoferritine (saure, mittlere und alkalische Ferritine);
- 3) die Herstellung polyklonaler Antiseren gegen saures Ferritin durch Immunisierung mit sauren Herzferritinen und anschließende Prüfung der Spezifität der Antikörper für verschiedene Ferritin-Fraktionen;
- 4) die Entwicklung eines hochempfindlichen Ferritin-S-Radioimmunoassays mit Ermittlung eines Normalbereiches bei Gesunden;
- 5) die Bestimmung von saurem Ferritin in einigen ausgewählten Patientenkollektiven mit benignen und malignen Erkrankungen und Untersuchung auf signifikante Unterschiede;
- 6) die Bestimmung von überwiegend alkalischen Ferritinen mit einem konventionellen Ferritin-RIA in den gleichen Kollektiven;
- 7) ein statistischer Vergleich der mit beiden Ferritin-Tests erhobenen Befunde der verschiedenen Kollektive in Bezug auf ihre Differenzierung zwischen benignen und malignen Erkrankungen.

2. H A U P T T E I L

2.1. FREMDUNTERSUCHUNGEN ÜBER FERRITIN

2.1.1. Struktur des Ferritins

Quartärstruktur

In seiner Quartärstruktur stellt sich das Ferritinmolekül als Hohlkugel mit einem Außendurchmesser von etwa 120Å (121) und einem Innendurchmesser von 70 bis 75Å dar (97). Die Proteinhülle besteht aus 24 Untereinheiten (132) und umschließt einen Kern aus mikrokristallinem Eisen(III)-oxihydroxidphosphat (122), der maximal 4500 Eisenatome enthalten kann.

Die Proteinhülle des Apoferritins (=Proteinhülle ohne Eisenkern) wird von sechs hydrophoben "Kanälen" für den Durchtritt kleiner Moleküle durchsetzt, welche sich jeweils entlang der 4-fachen Symmetrieachsen erstrecken (213, 184, 246) und zirka 10 Angström weit sind (3Å nach (246)). Nach Rice et al. (246) gibt es darüber hinaus noch acht weitere hydrophile Poren entlang der 3-fachen Symmetrieachsen.

Zwei Arten von Untereinheiten stehen für den Aufbau des Gesamtmoleküls zur Verfügung (4, 91, 143), welche beim Menschen ein Molekulargewicht (MG) von 21 099 und 19 766 Dalton haben (38). Das Molekulargewicht des Apoferritins schwankt deshalb zwischen ca. 450000 und 500000 (15). Bei voller Eisenbeladung kann ein MG von 900 000 erreicht werden, wobei unter physiologischen Bedingungen meist nicht mehr als 2500 Eisenatome aufgenommen werden (123).

Die spezies- und organotypische unterschiedliche Kombination dieser H- und L-Untereinheiten ("H" für "heavy" und "L" für "light" (14, 15)) zum Ferritinmolekül wird verantwortlich gemacht für die von Richter und Mitarbeitern erstmals erkannten

Variationen im elektrophoretischen Muster zwischen Ferritinen aus Normal- und Tumorgewebe (248, 175), zwischen verschiedenen Geweben einer Spezies (76) und für die Bandenmuster gereinigter Gewebsferritine, wie sie sich in der Technik der Isoelektrofokussierung darstellen (89). Das jeweilige "Ferritinprofil" ist während der Entwicklung und im Verlauf von Erkrankungen, vor allem Störungen im Eisenstoffwechsel, Veränderungen unterworfen (siehe entsprechende Kapitel) (241, 9, 249, 91).

Andere Autoren fordern für die gefundenen verschiedenen Ferritinklassen in einem Organ (Muskel und Knochenmark von Säugern (184, 102), Lungenschnecken (36) und siderotischen Mäuselebern (203)) entweder zusätzliche Arten von Untereinheiten (226, 276a, 203, 36, 66) oder mehr als 24 Einheiten pro Molekül (184).

Ferritin neigt außerdem dazu, sich zu Dimeren, Trimeren und größeren Oligomeren zusammenzulagern (283, 134), wobei einige Autoren die Bindung für reversibel (176), andere für kovalent halten (283, 217). Die physiologische Bedeutung wird in einer Art Übergangsform zwischen gealtertem Ferritin und Hämosiderin, dem Abbauprodukt von Ferritin, gesehen.

Die Mikroheterogenität der Serumferritine beruht nach Worwood et al. (288) mehr auf einer zusätzlichen Glykosylierung als auf einer Variation des Verhältnisses von H- und L-Ketten. Cragg und Mitarbeiter entdeckten eine dritte "G-Untereinheit" mit einem MG von 23 000, die am ehesten ein glykosyliertes Derivat der L-Untereinheit darstellt (72). Auch eine Bindung von Gewebsferritinen an Lipide wird beschrieben (57).

Tertiärstruktur

Die Untereinheiten des Ferritinmoleküls haben etwa die Form eines Zylinders mit einer Dicke von 27 und einer Breite von 55 Å. Parallel zur Breitseite sind vier α -Helices (A bis D) und eine lange Schleife ohne Helixkonfiguration ("long loop") die Helix B und C verbindet, angeordnet. Die fünfte α -Helix (E) am Ende der Aminosäurenkette bildet dazu einen spitzen Winkel (246, 98, 243).

Der Zusammenhalt der Untereinheiten wird durch hydrophobe Wechselwirkungen gewährleistet, wobei im Dimer die Helices gegenläufig parallel zueinander liegen und die E-Helices einen rechten Winkel bilden.

Für die Allgemeingültigkeit dieser dreidimensionalen Struktur für alle Spezies sprechen Röntgenstrahlen-Beugungsstudien (246, 98, 243) und die freie Austauschbarkeit von Untereinheiten verschiedener Spezies bei der Bildung von Apoferritin (225). Computerberechnungen auf der Grundlage der Aminosäuresequenzen ergaben für die beiden Untereinheiten eine sehr ähnliche Faltstruktur (38).

Primär-, Sekundärstruktur und genetische Kodierung

In den letzten Jahren gelang die vollständige Decodierung der Nukleotid- und Aminosäuresequenz der L-Untereinheit aus Leber und Milz von Pferd (130), Ratte (177) und Mensch (293, 2) und der H-Untereinheit des Menschen (64, 37): Erstere besteht beim Menschen aus 174, letztere aus 190 Aminosäuren (64, 293, 2). Kürzlich gelang es der Arbeitsgruppe von S. Levi (179) sogar, die Kodierungsregion für menschliche H-Ketten

in das Genom eines E. coli-Klons zu inserieren. Die dadurch in hoher Konzentration rein gewonnenen H-Ketten aggregieren spontan zu einem H-Homopolymer, das in der Natur in dieser Form nicht existiert.

Die Unterschiede der Nukleotidsequenz von H- und L-Ketten des Menschen (25% effektiver Basenaustausch (38)) entsprechen etwa einer genetischen Trennung vor 200 Millionen Jahren, die Trennung der L-Ketten von Mensch und Ratte (8,6% effektiver Basenaustausch) fand vor ca. 85 Millionen Jahren statt.

Obwohl zwischen den H- und L-Aminosäurenketten nur 55% Homologie besteht (66), haben sich an den Kontaktstellen für die Polymerbildung hydrophobe Aminosäuren erhalten. Der erfolgte Austausch einer hydrophoben (LEU) durch eine hydrophile Aminosäure (HIS) in der H-Kette im Bereich der hydrophoben Poren, an denen jeweils vier E-Helices beteiligt sind, soll bei zunehmendem Anteil von H-Elementen für eine Veränderung des Charakters der Pore und damit für eine Funktionsänderung des Moleküls verantwortlich sein. Auch die Bindungsstellen für Eisen an der Schaleninnenseite sind bei den H-Elementen vermindert (38). Nach den Modellen von Chou und Fassman (61) und Harrison (243) enthalten jedoch beide Kettentypen fünf einander entsprechende α -Helixbereiche.

Für die gefundenen geringen Unterschiede in der Aminosäuresequenz innerhalb von H- oder L-Ketten eines einzigen Organs mit bis zu zehn Aminosäurenaustauschen (293, 81, 64, 2) wird nach neueren Arbeiten von Boyd (37), Constanzo (64) und Jain (154) die Kodierung durch "Genfamilien" verantwortlich gemacht: 12 H-Gene und 8 L-Gene (154) auf bis zu acht verschiedenen Chromosomen (75, 174) wurden bisher entdeckt. Eine organspezifische Regulation dieser Gene könnte dann auch den Polymorphismus der Ferritine in der Elektrophorese (s.o.) erklären. Aktive Gene wurden jedoch bisher nur auf Chromosom 11 (H-Kette) bzw. Chromosom 19 (L-Kette) entdeckt (45, 291).

2.1.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Das wasserlösliche, rotbraune Ferritin besitzt eine hohe Stabilität, so ist z.B. zwischen einem pH von 2,8 bis 10,6 (77), bis zu einer Temperatur von 70 bis 80°C (170) und gegenüber Harnstoff bis zu einer Konzentration von 8-10 mol/l (133) beständig.

Reversibel ausfällbar aus einer Lösung ist es mit 35%igem Ammoniumsulfat, reversibel kristallisierbar mit 5%igem Cadmiumsulfat (111), H-Ketten-reiche Formen mit 15%igem Polyethylenglykol oder 2-methyl-2,4-pentandiol (31).

Die Trennung des farblosen Apoferritins von seinem Kern aus Eisen-(III)-hydroxidphosphat kann physikalisch durch Zentrifugation in einem Dichtegradienten oder chemisch durch Reduktion des Fe(III) zu Fe(II) mit Reduktionsmitteln in Kombination mit Chelatbildnern (z.B. EDTA, Desferrioxamin, o-Phe-nanthrolen), welche die Reoxidation des freigewordenen Eisens verhindern, erfolgen (39). Die Reaktion läuft auch mit Chelatbildnern allein ab, allerdings nur sehr langsam.

Die Reduktionsmittel müssen klein genug sein, um die Kanäle der Proteinhülle mit den katalytischen Gruppen erreichen zu können (157) (z.B. Dithionit, Thioglykolsäure und biologische Reduktionsmittel wie Cystein, Glutathion, Ascorbinsäure). Reduzierte Riboflavine (FMNH_2 , FADH_2) bewirken eine sehr schnelle Reduktion (78).

Denaturiert wird Apoferritin durch Kochen, Lyophilisieren oder einfrieren (vor allem gereinigtes, hochkonzentriertes Material) (133, 202).

Die Dissoziation in die Untereinheiten kann mit Sodiumdodecylsulfat plus Merkaptoethanol (278) (3' bei 100°C), Guadiniumchlorid (7M, pH 4,5) oder in 9M Harnstoff, pH 2,5 (142) er-

reicht werden. Die Ferritinuntereinheiten unterscheiden sich in Größe und Molekulargewicht (siehe 2.1.1), ihrer Aminosäuresequenz und der Zusammensetzung ihres Kohlenhydratanteils (ca. 2-5%) (141, 258, 116).

In der Gelelektrophorese stellen sich die Ferritinmonomere verschiedener Organe, Tumoren und Spezies als Einfach- oder Doppelbanden mit gering variabler Wanderungsgeschwindigkeit dar, eine eindeutige Zuordnung ist dadurch jedoch nicht möglich (212, 248, 76). Der Eisengehalt des Moleküls beeinflusst das Wanderungsverhalten dabei nicht (270).

Die Isoelektrofokussierung zeigt bis zu 20 Banden von "Isoferritinen" in einem weiten pH-Bereich von 4,6 bis 5,8 (9, 91, 242), wobei es zwar gewebstypische Muster gibt, die aber bei Betrachtung einer Vielzahl von Geweben und Spezies grosse Überlappungen zeigen.

Abgesehen von der noch weitergehenden Differenzierung von H- und L-Untereinheiten in Subpopulationen bewirkt ein hoher Anteil an L-Ketten einen hohen isoelektrischen Punkt (pI) eines Ferritins (5).

Die Bandenspektren aller Ferritine in der Isoelektrofokussierung enden auf der alkalischen Seite zwischen pH 5,5 und 5,8. Variabler ist der Beginn auf der sauren Seite: Leber- und Milzferritin beginnen bei pH 5,0 bis 5,4 (13, 295, 9), Pankreas-, Kolon- und Knochenmarksferritin bei pH 5,2 (116), Nieren- und Kolonkarzinomferritine bei pH 5,25 (295, 116), Plazenta-, Lungen- und fetales Leberferritin bei pH 4,7- 4,8 (90, 185, 9). Die sauersten Isoferritine enthalten Herzferritin mit Beginn bei pH 4,6 (13) und Hela-Zellferritin, welches nur ein sehr schmales Spektrum zwischen pH 4,8 und 5,0 umfaßt (90).

Hela-Ferritin enthält etwa 90% H- und 10% L-Ketten (250), Herz-

ferritin 70% H- und 30% L-Ketten und Leberferritin etwa 10% H- und 90% L-Ketten (195).

Ferritine aus malignen Tumoren lassen bei dieser Auftrennung keine spezifischen, diagnostisch eindeutig verwertbaren Unterschiede erkennen, allenfalls eine Verschiebung des Spektrums in den sauren Bereich (13, 282).

Humanes Serumferritin bindet, entsprechend seines höheren Gehaltes an Kohlenhydraten in Form von glykosylierten G-Untereinheiten (72) zu ca. 60-80% an das Lectin Concanavalin A (238).

Die Halbwertszeit i.v. applizierter Ferritine ist von verschiedenen Faktoren abhängig: Glykosylierung verlängert sie (glykosyliertes Serumferritin 30 h, nicht glykosyliertes 5 h (289), Gewebserferritine 10 min. (73)) ebenso wie ein hoher Gehalt an L-Ketten (nicht glykosyliertes Serumferritin ist sehr alkalisch; Komplexbildung zwischen H-Ketten und Serumproteinen mit sehr rascher Clearance in der Leber (73, 68)). Über den Beitrag des Eisengehaltes besteht Uneinigkeit, neuere Arbeiten verneinen eine direkte Beziehung zwischen Eisengehalt und Clearance des Ferritins (67).

In der Isoelektrofokussierung umfaßt das Serumferritin den gesamten pI-Bereich der Gewebserferritine (117), für die sauren Komponenten sind hier jedoch nicht H-Ketten verantwortlich, sondern wahrscheinlich die Glykosylierung, da die sauren Banden nach der Abspaltung von Sialisäuren durch Neuraminidase verschwinden (72).

2.1.3 Eisenmetabolismus

Das Apoferritinmolekül kann bis zu 4500 zweiwertige Eisentome in einer Mizelle aus Eisen(III)-hydroxidphosphat ent-

halten, die Kinetik für Aufnahme oder Freisetzung des Metalls ist bei 1200 bis 1400 Eisenatomen pro Schale am günstigsten (79). Das Phosphat stellt keine essentielle Komponente dar (67).

Die Aufnahme ist an die Oxidation des zweiwertigen Eisens gebunden, das Apoferritin selbst fungiert dabei als Ferroxidase (215). Auch Fe(III) kann inkorporiert werden, jedoch nur zehnmal langsamer (124).

Nach neueren Arbeiten von Harrison et al. (98) und Niederer und Mitarbeitern (215) findet diese Oxidation in den acht hydrophilen Kanälen über zwei hintereinander geschaltete Bindungsstellen statt, wobei die innere das an der äußeren aus Fe(II) entstandene Fe(III) übernimmt und sukzessive an die Mizelle ins Innere abgibt.

Auch die sechs hydrophoben Kanäle zwischen jeweils vier Untereinheiten dienen dem Eisentransport (246, 98): Die schnellere Eisenumsetzung H-reicher Ferritine (271) wird durch das Neuauftreten eines eisenaffineren Histidinrestes bei H-Ketten in diesem Bereich erklärt (38, 279), die Eisenakkumulation in alkalischen Ferritinen durch das Überwiegen hydrophober Aminosäuren an Eisenbindungsstellen an der Schaleninnenseite (38). Im Gegensatz zu früheren Ergebnissen, daß L-Kettenreiche Ferritine durchschnittlich mehr Eisen enthalten und auch schneller aufnehmen können (60), fanden Wagstaff und Bomford und Mitarbeiter (271, 35) einen höheren Eisengehalt saurer humaner Ferritine und auch eine höhere Aufnahmerate von Eisen als bei alkalischen Ferritinen.

Die Freisetzung von Eisen läuft auf entgegengesetztem Weg als die Oxidation ab und erfordert eine Reduktion des Fe(III). Physiologische Coenzyme sind dabei FMNH, FADH_2 und NADH (siehe 2.1.2). Nach Crichton (80) läuft diese Reaktion in Mitochondrien oder Lysosomen ab, denn dort kann das entstehende

Zellgift O_2 von der Cytochromoxidase abgefangen werden (259).

Auf zellulärer Ebene nehmen von den beiden wichtigsten Eisenspeicherzellen die Zellen des RES (Milz, Kupffer'sche Sternzellen der Leber) Eisen in Form von nicht lebensfähigen Erythrozyten und Eisensalzen, die Hepatozyten in Form von Transferrin, Hämoglobin/Haptoglobin-Komplexen, Eisensalzen und Ferritin durch Endozytose auf. Die Endozytosevesikel verschmelzen mit Lysosomen zu "sekundären Lysosomen", wo das Metall enzymatisch freigesetzt wird. Ein Großteil des entstehenden "Apotransferrins" wird an der Zelloberfläche wieder freigesetzt (213). Das freigewordene Eisen wird entweder durch lysosomales Ferritin aufgenommen (247) oder an zytoplasmatisches Ferritin (223) oder an einen intrazellulären Pool chelatierbaren Eisens abgegeben (281).

2.1.4 immunologische Eigenschaften der Isoferritine

Die immunologischen Eigenschaften der Isoferritine stehen in enger Beziehung zu ihren strukturellen und möglicherweise auch funktionellen Eigenschaften.

Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten: Die Isoferritine können sich in ihrer Primärstruktur (a) oder durch posttranslationale Veränderungen (b) immunologisch unterscheiden. Die Unterschiede können bedingt sein durch die Art des Gewebes, Veränderungen im Laufe der Entwicklung des Organismus (9) oder durch maligne Tumoren (s.u.). Außerdem ist es von Bedeutung, ob diese Unterschiede nur zwischen Gewebserritinen oder auch zwischen Serumferritinen feststellbar sind.

Beispiele für (b) sind Veränderungen, die durch Glykosylierung von Gewebs- oder Serumferritinen (288, 253) bzw. das Vorhandensein einer zusätzlichen, glykosylierten G-Untereinheit im Serum (72) entstehen. Unterschiede in den Kohlenhydratanteilen konnten schon sehr früh nachgewiesen werden (82). Außerdem beeinflußt der Eisengehalt eines Gewebes das Isoferritinprofil, da Eisenadministration vornehmlich die Bildung L-Ketten-reicher Ferritine stimuliert (253). Nach Hoy und Jacobs (134) geht auch die Bildung von Ferritinpolymeren, welche sehr eisenreich, weniger gut löslich und hitzestabil und eher sauer sind, mit Oberflächen- bzw. sogar Konformationsveränderungen einher. Arosio vermutete schließlich eine Konformationsänderung des Moleküls mit zunehmender Zahl von H-Ketten, wodurch neue antigene Determinanten exponiert werden sollen (47).

Zu (a):

Erste Hinweise auf immunologische Unterschiede von Ferritinen fanden Linder/Horowitz und Mitarbeiter (180) und später auch Hazard et al. (127) aufgrund unterschiedlicher Affinität verschiedener Organferritine gegenüber einem Ferritinantikörper. Da das Bindungsverhalten der Ferritine mit dem jeweiligen pI bzw. dem Verhältnis von H- zu L-Ketten korrelierte, sah man als eine Hauptursache unterschiedliche antigene Determinanten auf beiden Untereinheiten an. Andere Untersucher bestätigten die immunologische Unterscheidbarkeit von sauren (pI 4,6 bis 5,2), alkalischen (pI 5,3 bis 5,8) und intermediären Isoferritinen (13).

Es wurden früh Abweichungen im Aminosäuren- und Peptidgehalt gesehen (76), die Dekodierung der H- und L-Kettengene mit nur 55% Homologie und die Entdeckung der "Genfamilien", die eine zusätzliche Variabilität von H- und L-Ketten untereinander bedingen, erbrachten den Beweis einer unterschiedlichen Primärstruktur.

Es wurden im Laufe der Jahre polyklonale Antikörper gegen humanes Gesamtherz-, Gesamtleber- oder Hela-Zellferritin mit abnehmender Kreuzreaktivität mit dem Ferritin vom anderen Ende des pI-Spektrums gewonnen (127, 126, 160, 16). Die jüngsten Ergebnisse aus der Testung von 28 hochspezifischen monoklonalen Antikörpern gegen Herz- oder Leberferritin oder deren Untereinheiten mit verschiedenen immunologischen Methoden (Doppeldiffusionstests, Immunoblotting, IRMA, RIA, Immunpräzipitation) ergab (195), daß Herzferritin immunologisch, ebenso wie strukturell, heterogener ist als Leberferritin (Antikörper gegen Leberferritin erkannten nur L-Ketten, solche gegen Herzferritin teilweise auch H- und L-Ketten) und daß die antigenen Determinanten der beiden Untereinheiten zwar wohl ähnlich aber nicht identisch sind bzw. identische einzelne Epitope zumindest in unterschiedlicher Dichte vorkommen: Keiner der Antikörper reagierte gleich stark mit Leber- und Herzferritin.

Da sich alle anti-H- und alle anti-L-Ketten-Antikörper untereinander, jedoch nicht gegenseitig aus der Bindung am Antigen verdrängten, müssen die identischen Epitope außerdem auf den Untereinheiten sehr eng benachbart liegen.

Eine Erklärung für die höhere Spezifität von Sandwich-Assays für saure Ferritine mit sehr hohem Anteil an H-Ketten wird in der Anordnung von H- und L-Ketten in sogenannten "Klustern" gesehen, so daß aufgrund sterischer Behinderung erst bei einer relativ höheren Anzahl saurer Ketten Mehrfachbindungen an einem Ferritinmolekül möglich werden. Die Synthese der Untereinheiten an getrennten mRNA's (276) macht nach ihrer Ansicht eine Bildung von homogen aus einer Kettenart bestehenden "Polymeren" vor der endgültigen Aggregation zum vollen Molekül auch durchaus plausibel (195).

Die G-Untereinheiten reagierten nur mit monoklonalen anti-L-Antikörpern, jedoch immer schwächer als die L-Ketten selbst.

Da die mindestens drei Epitope der einzigen Glykosylierungsstelle nicht eng benachbart liegen (3), werden neben den Zuckerresten noch weitere strukturelle Unterschiede zu den L-Ketten vermutet (255).

Neben der Unterscheidbarkeit von Ferritinen aus normalen Geweben war die Entdeckung besonders saurer Ferritine in fetaler Leber vor der 20. Schwangerschaftswoche (9) und in einer Vielzahl tierischer und menschlicher Tumoren (13), weshalb diese Ferritine entsprechend als "karzinofetal" bezeichnet wurden, besonders interessant (125).

Es gelang zwar früh die Darstellung dieser Tumorferritine durch die Isoelektrofokussierung (13, 282, 91, 9, 90, 185), eine immunologische Unterscheidung erwies sich aufgrund der hohen Kreuzreaktivität zwischen sauren und alkalischen Ferritinen als sehr schwierig (127, 126, 16, 160, 198, 296, 218) und wurde erst durch die Entwicklung hochspezifischer monoklonaler Antikörper möglich (47).

Auch das im Serum meßbare Ferritin, das normalerweise eisenarmem Leber- oder Milzferritin entspricht (286), wird durch viele Tumorerkrankungen verändert: Neben einer Konzentrationserhöhung (290) sollen zusätzliche, immunologisch differenzierbare Isoferritine vom Hela-Typ auftreten. Die Ergebnisse über solche Isoferritine im Serum sind allerdings sehr widersprüchlich (siehe 2.1.7.).

2.1.5 Ferritinmetabolismus: Synthese, Regulation und Abbau

Watanabe und Drysdale erbrachten 1981 erstmals den Nachweis unterschiedlicher messenger-RNA's (mRNA's) für beide Ferritinuntereinheiten (276). Die Genvorlagen sind als "Genfamili-

lien" mit geringen Variationen auf verschiedenen Chromosomen zu finden. Auch die glykosylierte Untereinheit des Serumferritins soll von eigenen mRNA's kodiert werden (92).

Die intrazellulären H- und L-mRNA Konzentrationen in verschiedenen Geweben spiegeln die relativen Mengen von H- und L-Ketten dieses Gewebes wider, d.h. es muß eine gewebsspezifische Regulation der mRNA-Synthese (Transkription) geben (65). Auch der stimulierende Effekt von Nichthäm-Eisen auf die Synthese der Untereinheiten ist unterschiedlich:

Untersuchungen mit poly- und monoklonalen Antikörpern aus früheren Jahren zeigten, daß in vielen Geweben, im Serum und in Zellkulturen bei Zufuhr von ionisiertem Eisen vorwiegend die Konzentration L-Ketten-reicher Ferritine zunimmt (213, 253, 163). Cairo und Mitarbeiter konnten 1985 jedoch zeigen, daß in Hela-Zellkulturen Eisenzufuhr die Synthese beider Untereinheiten gleich stark stimuliert (42). In anderen Systemen wie z.B. normalen oder leukämischen Leukozyten mit eisenarmen Ferritinen hat Eisen wiederum kaum einen Einfluß auf die Synthese des Proteins (92).

Die Regulation durch Eisen erfolgt auf translationeller (a), posttranslationeller (b) und wahrscheinlich auch auf transkriptioneller Ebene (c):

Eisen stimuliert die Aggregation freier Untereinheiten zu Apoferritinschalen (b) (92), es verbessert die Translation vorher inaktiver mRNA's, möglicherweise durch Verminderung freier Ferritinuntereinheiten, die als Repressor fungieren (Endprodukthemmung), oder durch Umverteilung der mRNA's innerhalb der Zelle in die Polysomenfraktion (a) (297, 19), und es stimuliert nach Cairo et al. (42) bei Hela-Zellen die Neusynthese von mRNA sowohl im Zellkern als auch im Zytosol (c). Andere Autoren fanden jedoch keine Änderung der Gesamt-mRNA-Konzentration bei Eisenzufuhr (297, 19).

Neuere Untersuchungen maligner und nichtmaligner lymphatischer Gewebe verschiedener Zelllinien, Differenzierungsgrade und Proliferationseigenschaften zeigten entsprechend der sehr variablen relativen Anteile von H- und L-Ketten gleichsinnige Veränderungen der mRNA-Konzentrationen (43). Deutliche Änderungen im H- und L-Ketten-mRNA-Bestand begleiten auch die Differenzierung von Myelo- und Erythrozyten (62). Cairo schloß daraus auf eine vorwiegend transkriptionelle Modulation der Ferritinsynthese bei Zelldifferenzierungen und maligner Transformation, wie z.B. chromosomale Translokation oder Gen-Neugruppierungen (43). Eine häufige Translokation von Chromosom 11 (H-Kettengene!) bei akuten Leukämien ist beschrieben (161). Abweichungen an Ferritingenen selbst konnten jedoch noch nicht nachgewiesen werden.

Der Syntheseort der für die Eisenspeicherung verantwortlichen Gewebsefferritine sind die freien Polysomen der Zelle (213), die Serumferritine werden an den ans endoplasmatische Retikulum gebundenen Polysomen ("rauhes ER"), wahrscheinlich der Zellen des RES (149), synthetisiert, glykosyliert und ins Plasma sezerniert (83, 67).

Der Abbau des Gewebsefferritins beginnt mit geringen Oberflächenveränderungen des alternden Ferritinmoleküls, gefolgt von Polymerisation und Aufnahme der Polymere in Lysosomen, wo eine teilweise Verdauung der Proteinhülle erfolgt, deren Endprodukt schließlich Hämodiderin darstellt (134).

Injizierte Gewebsefferritine werden sehr schnell von der Leber aufgenommen und abgebaut ($t_2 = 9$ min.), die Halbwertszeit humaner Plasmaferritine beträgt hingegen 30 h. Glykosylierung und hoher Eisengehalt schützen Ferritine vor dem Abbau; Komplexbildung mit Serumproteinen soll vor allem die Halbwertszeit saurer Ferritine im Serum verkürzen (68) (siehe 2.1.2.).

2.1.6 Vorkommen und physiologische Bedeutung der Isoferritine

Ferritin war erstmals aus Pferdemilz isoliert worden (170), Verfeinerte Nachweismethoden identifizierten es später in allen Geweben und Organen bisher untersuchter Säugetiere. Auch in Amphibien, Fischen, Insekten, Würmern und Pflanzenzellen bis hinab zu den Pilzen fand man Ferritine als Hinweis auf ihre frühe Entstehung in der Evolution (213).

In den eisenspeichernden Organen wie Milz und Leber mit den höchsten Ferritinkonzentrationen überwiegen, ebenso wie in Niere (295), Pankreas, Kolon (116), Knochenmark und im Serum (71), alkalische Ferritine, in Hela- und Herzzellen (13), Plazenta (173), fetaler Leber (6), Blutzellen (53) und einigen Tumoren (siehe 2.1.7) herrschen saure Ferritine vor.

Alle extrazellulären Flüssigkeiten des Menschen enthalten in variabler Konzentration (0- 10µg/ml) Ferritine, relativ hohe Anteile an sauren Ferritinen (Über 50ng/ml) zeigten nur Sperma, Kolostrum und Muttermilch, mit bis zu 50% lag der Gehalt an glykosylierten Ferritinen deutlich über dem der Gewebsferritine (253).

Eine der Hauptaufgaben des Proteins ist die Speicherung von Eisen im Gewebe und die Sicherung der Eisenreserve für die Synthese von Häm und anderen eisenhaltigen Proteinen (100- 1000 mg Eisenreserve bei einem täglichen Eisenbedarf von 1 bis 1,5 mg). Den größten täglichen Eisenumsatz bewältigt dabei das retikuloendotheliale System mit 20 mg. Bei starker Hämolyse ist eine Eisenaufnahme bis 400 mg/Tag möglich (95).

Bei Eisenüberladung schützt Ferritin vor den toxischen Einflüssen des freien Metalls wie Peroxidation lysosomaler Membranen mit intrazellulärer Freisetzung schädlicher Enzyme, bei

Eisenmangel kann Eisen schnell aus Ferritin mobilisiert werden. In der Darmmukosa hat Ferritin auch eine regulative Funktion: Aus dem Darmlumen resorbiertes Eisen wird in variablem Prozentsatz im Ferritin zurückgehalten und durch Zellabschilferung wieder in den Darm abgegeben. (136).

Diese enge Beziehung zum Eisenstoffwechsel besteht in erster Linie für alkalische Ferritine: Nach Linder und Munro (182) enthalten eisenspeichernde Organe vorwiegend L-Ketten-reiche Ferritine, welche einen durchschnittlich höheren Eisengehalt haben, Eisen schneller aufnehmen können (60) und sich bei Eisenzufuhr stark vermehren (297, 38,163,253,213), so daß die Gewebesferritinkonzentration den Eisengehalt der Organe und des Gesamtorganismus widerspiegelt (96, 181).

Die normale Konzentration der vorwiegend alkalischen Plasmaferritine des Erwachsenen beträgt 15 bis 300 µg/ml und korreliert beim Gesunden ebenfalls mit dem Gesamteisenspeicher (253, 148, 272a), wobei 1 µg Ferritin etwa 8 mg Speichereisen entspricht. Der Eisengehalt des Plasmaferritins ist jedoch auch bei Eisenüberladung gering (292). Die schnelle Komplexbildung saurer Isoferritine mit Plasmaproteinen (73, 68) soll nach Covell (67) eventuell deren Akkumulation im Plasma und anderen Körperflüssigkeiten verhindern, da sie lokal an der Regulation der Myelopoese und immunsuppressiver Effekte beteiligt sein sollen (41).

Am Beispiel von Knochenmarkszellen (Monozyten und erythropoetische Zellen), in welchen die vorwiegend sauren die alkalischen Ferritine an Eisengehalt und -aufnahme rate übertreffen (271, 35), entstand die Vorstellung einer Funktionsteilung:

Saure Ferritine stellen kurzfristige Eisenspeicher mit aktiverem Eisenmetabolismus, alkalische Ferritine mehr stabile Eisenreserven dar (159,237) . Des weiteren sollen in sehr unreifen Erythroblasten die sauren Ferritine eine Rolle im intrazellulären Eisentransport zwischen Plasmamembran und Mito-

chondrien spielen (152) und von diesen auch sezerniert werden (41).

Die Zellen des peripheren Blutes bieten noch weitere interessante Aspekte:

Monozyten enthalten überwiegend saure Ferritine (159), T-Lymphozyten synthetisieren mehr Ferritin als B-Lymphozyten (86), wobei der Gehalt an sauren Ketten jeweils am größten in unreifen und proliferierenden Zellen (z.B. Thymozyten) ist (268). Oberflächenferritin wird jedoch weitaus häufiger auf B- als auf T-Lymphozyten (75% zu 6%) und auch auf Erythroblasten exprimiert (74).

Nach De Sousa (261) soll das Oberflächenferritin die Wanderung der B-Lymphozyten im Körper dirigieren. Matzner und Mitarbeiter (204) konnten einen suppressiven Effekt vor allem saurer Ferritine auf die in vitro Antwort von T-Lymphozyten auf Mitogene nachweisen und vermuteten deren Beteiligung an der Entwicklung abnormaler T-Zellfunktionen bei malignen Erkrankungen. Einige saure Ferritine aus Monozyten- und Makrophagensubpopulationen, welche an Con A binden, spielen anscheinend eine Rolle in der Regulation der Hämopoese: Sie hemmen nach Broxmeyer et al. (41) das Wachstum multipotenter Granulozyten-, Makrophagen- und Erythrozytenvorläuferzellen in einer Art negativen "feed back" Mechanismus. Diese hemmenden Stoffe kommen in leukämischen Zellen zwar in erhöhter Konzentration vor, die Vorläuferzellen dieser Patienten sind jedoch unempfindlich dagegen und gewinnen so möglicherweise einen Wachstumsvorteil.

Die Bedeutung spezieller Ferritinrezeptoren, z.B. an der Leber von Ratten (197), ist noch weitgehend unklar.

Neuere in vitro-Untersuchungen an normalen und leukämischen Knochenmarkszellen konnten zeigen, daß Transferrinrezeptorzahl und Ferritingehalt der Zelle adaptive Phänomene sind und untereinander in reziproker Beziehung stehen (245).

2.1.7 Ätiologie pathologisch veränderter Ferritine in Geweben, im Serum und auf Zelloberflächen

a) in Geweben

Bei den Eisenspeicherkrankheiten unterscheidet man zwei Grundformen 95):

Zum einen Krankheiten mit gesteigerter Erythropoese. Dabei wird über eine gesteigerte Zahl von Transferrinrezeptoren im Knochenmark (Regulator) durch vermehrte Darmresorption und Freisetzung aus dem RES (retikuloendotheliales System) mehr Eisen bereitgestellt. Übertrifft dieses Angebot den Bedarf für die Erythropoese, so kommt es zu einer Eisenablagerung vorwiegend in Parenchymzellen, wo sie eine Dysfunktion hervorrufen kann. Dieser Mechanismus trifft zu bei Anämien mit Eisenverwertungsstörungen (z.B. sideroachrestische Anämie), hämolytischen Anämien (auch Thalassämia major), häufigen Bluttransfusionen und auch bei der idiopathischen Hämochromatose mit erblich bedingter gesteigerter Eisenresorption.

Zum anderen Krankheiten mit hypoplastischem Knochenmark oder ineffektiver Erythropoese (aplastische Anämien, perniziöse Anämie). Dort wird nichtverwertetes Eisen vorwiegend in den Zellen des RES abgelagert, ebenso bei vermehrter oraler oder parenteraler Eisenzufuhr in diesem Knochenmarksstadium und bei entzündlichen Erkrankungen.

Der Ferritingehalt der Eisenspeicherorgane und der Eisengehalt der Ferritine steigen dabei parallel zur Menge des Depoteisens an (300), wobei sich das Isoferritinprofil in Richtung der alkalischen Ferritine verschiebt (271). Bei zunehmender Eisenüberladung steigt der Anteil des Hämosiderins überproportional an (257), bei Eisenmangel sinkt der Gesamtferritingehalt proportional zum Eisengehalt der Gewebe ab.

Der Nachweis von Ferritinen in Tumorgeweben gelang bei so gut wie allen untersuchten menschlichen Neoplasien.

Berichte über Verschiebungen des Isoferritinspektrums betreffen in erster Linie Lebertumoren: Eine Zunahme saurer Ferritine fanden Whittaker et al. (282), Bullock et al. (40), Alpert et al. (9), Melia und Mitarbeiter (205), Niitsu et al. (218) und Kew et al. (162). Der Eisengehalt der Tumorferritine ist im Gegensatz zu dem saurer Ferritine aus normalem Gewebe niedrig (40). Da ähnliche Isoferritine aus foetaler Leber isoliert worden waren (9), sah man die Produktion saurer Ferritine durch die Hepatozyten als Entdifferenzierungszeichen an.

Saure Ferritine entdeckte man auch in Pankreas- und Mammakarzinomen (198), in Leber und Milz bei akuter myeloischer Leukämie (296), in der Milz von Patienten mit M. Hodgkin (118) und in Lungenkarzinomgewebe (185). Das sauerste bekannte Ferritin stammt ebenfalls aus einer malignen Zelllinie, den HeLa-Zellen (89). Alpert und Mitarbeiter postulierten sogar eine dritte, tumorspezifische Untereinheit oder zumindest eine unterschiedliche, dem Herzferritin ähnliche Primärstruktur der Leberkarzinomferritine (10, 11), was jedoch von anderen Untersuchern nicht bestätigt werden konnte (13, 282). Anderen Untersuchern gelang es auch nicht, in Nieren-, Pankreas-, Kolon- und Lungenkarzinomen eine Verschiebung des Isoferritinprofils nachzuweisen (116). Außerdem enthalten Herz-, Plazenta- oder Nierengewebe physiologischerweise auch saure Ferritine (90).

b) im Serum

Beim gesunden Erwachsenen gilt der Gesamtferritinspiegel als Indikator für die Eisenreserven des Körpers und korreliert spe-

ziell mit dem Nichteisengehalt des Knochenmarks (25). Er liegt zwischen 15 und 300 ng/ml (292), nach anderen Autoren zwischen 60 und 140 ng/ml (213). Bei Auftrennung nach dem Geschlecht wurden für Frauen Werte von 10 bis 145 ng/ml (199, 273), für Männer von 18 bis 180 (199) bzw. von 10 bis 193 ng/ml (273) angegeben. Die Normalwerte sind physiologischen Schwankungen im Laufe des Lebens unterworfen: In den ersten Wochen nach Geburt steigt das Ferritin auf etwa 300 ng/ml an, um nach drei Monaten einen Wert um 30 ng/ml zu erreichen, der dann bis zur Pubertät beibehalten wird. Während einer Schwangerschaft sinkt der Spiegel bis auf 12 ng/ml ab. Die Werte liegen bei der Frau im fortpflanzungsfähigen Alter durchschnittlich niedriger (um 35 ng/ml) als beim Mann (um 100 ng/ml). Nach der Menopause gleichen sich die weiblichen den männlichen Werten an (213).

Der Hauptanteil des Serumferritins reagiert mit anti-Milz- oder anti-Leberferritin-Antikörpern und zeigt nach Deglykosylierung in der Isoelektrofokussierung alkalische Banden (72).

Auf zweierlei Wegen kann Ferritin ins Blut gelangen:

- 1) aktive Sekretion durch Zellen: Physiologischerweise aus
----- RES-Zellen, ferner aus Zellen maligner Tumoren oder aus Blutzellen
(= eisenarm, 60-80% glykosyliert)
- 2) passive Freisetzung bei Zell-
----- schädigung oder -zerstörung: ----- Bei Gewebsnekrose, Zelldegeneration, chronischer Entzündung etc.
(= kaum glykosyliert, Eisengehalt entspricht dem des Gewebes)

Einen Überblick über die Ätiologie veränderter Serumspiegel gibt Tabelle 1.

Nichtmaligne Erkrankungen

1. Transfusionshäm siderose bei chronischen Anämien

Der Serumferritingehalt bei diesen Patienten, gemessen mit einem Anti-Leberferritin-Antikörper, liegt zwischen 500 und 5000 ng/ml und ist direkt proportional zur Zahl der erfolgten Bluttransfusionen (49). Das Ferritin ist nur zu 20% glykosyliert und stammt demnach aus dem Zytosol von Parenchymzellen. Dies trifft sowohl für die hyperplastischen als auch die hypoplastischen Anämien zu, bei letzteren wird das primär in den RES-Zellen abgelagerte Eisen rasch in die Parenchymzellen verlagert (Leber, Muskel, Drüsen).

Auch bei Patienten mit Thalassämia major ist das Serumferritin ein guter Indikator für die Lebereisenkonzentration und somit transfusionelle Eisenüberladung (200 pg/ml Ferritin im Serum entsprechen etwa 1 mg Lebereisen/g Lebertrockengewicht), wenn nicht zusätzlich eine chronische Virushepatitis oder ein anderer Entzündungsprozess vorliegt. Bei Ascorbinsäuremangel wird das Ergebnis der Serumferritinbestimmung außerdem durch eine verminderte Ferritinsynthese im RES verändert (52, 59). Die schwerere β -Thalassämie/HbE Krankheit zeigt höhere Werte als die Hb-H Krankheit, ohne Transfusionen bis ca. 2000 ng/ml.

2. Idiopathische Hämochromatose (IH)

Patienten mit unbehandelter IH können Serumferritinwerte über 6000 ng/ml (im Mittel 960 ng/ml) aufweisen, welche nach Therapie (Aderlässe) in den Normbereich abfallen. Beaumont et al. (22, 23) fanden im Gegensatz zu allen anderen Lebererkrankungen jedoch keine signifikante Korrelation zwischen Lebereisen, Leberferritin und Serumferritin. Als Ursache sehen Sie einen überproportionalen Häm siderinanstieg bei zunehmender

Eisenüberladung an. Solange die Parenchymzellen wenig geschädigt sind, entweicht kaum Ferritin. Dies ist der Grund für die Häufig normalen Serumwerte im Frühstadium der Erkrankung. Nach Beaumont sind die Serumferritine nur bei homozygoten Genträgern erhöht.

3. Entzündliche Erkrankungen

Unabhängig von der Art der Erkrankung (Tuberkulose, Pneumonie, Virushepatitis etc.) führt eine größere entzündliche Reaktion im Körper zu einer vermehrten Destruktion roter Blutkörperchen durch Makrophagen, einer Infektanämie durch Knochenmarkssuppression und einer retikuloendothelialen Aktivierung mit vermehrter Eisenaufnahme und blockierter -freisetzung (128). Dies führt dort zu einem raschen Anstieg der Ferritinsynthese, gefolgt von einem Serumferritinanstieg nach etwa 30 h (80% glykosyliert!) (29). Lipschitz et al. (189) fanden einen Mittelwert von 305 ng/ml bei einem Normalbereich von 10 bis 165 ng/ml. Ferritin stellt damit ein "Akutphasenprotein" dar und spiegelt bei Serienbestimmung den Aktivitätsverlauf der Entzündung, parallel z.B. zum C-reaktiven Protein, wider (83). Das Serumferritin ist dabei jedoch nicht unabhängig von den Eisenreserven: Patienten mit aktiver rheumatoider Arthritis und Eisenmangel zeigen entweder überhaupt keine Korrelation zu anderen Entzündungszeichen oder eine Parallelität zum CRP auf niedrigerem, d.h. eventuell normalem, Niveau (231, 21).

4. Lebererkrankungen

In einer Studie von Chapman et al. (58) wiesen bei einer obe-

ren Normgrenze von 340 ng/ml alle untersuchten Patienten mit Lebererkrankungen, bei Lundin und Mitarbeitern (193) 43% der Patienten mit chronischem Alkoholabusus erhöhte Serumferritinwerte auf. Bei Werten bis 2500 ng/ml fand sich bei chronisch alkoholischem Leberschaden, ebenso wie bei β -Thalassämia major und der IH, der höchste relative Anstieg an nicht-glykosyliertem Ferritin. Bei chronisch aktiver Hepatitis stieg der Anteil im Mittel auf 35%, bei primär biliärer Zirrhose auf 25% an (20% nicht-glykosyliertes Ferritin im Normalserum). Dies weist, zusammen mit der signifikanten Korrelation des Gesamtferritins mit den Serumtransaminasen, auf die große Bedeutung der Zellschädigung für die Ferritinerhöhung hin. Es ist jedoch nicht möglich, anhand des Bindungsverhaltens an Concanavalin A zwischen Eisenüberladung und Leberzellzerstörung zu unterscheiden (58). Bei starker Reduzierung des funktionstüchtigen Lebergewebes spielt zunehmend auch eine Abnahme der Ferritinclearance eine Rolle.

5. Weitere nichtmaligne Erkrankungen mit Serumferritinerhöhungen

Erhöhte Ferritinwerte wurden auch bei verschiedenen Arten von chronischer Pankreatitis (Mittelwert 150 ng/ml, Kontrollen 62,9 ng/ml), die höchsten bei chronisch rezidivierendem Krankheitsverlauf (Mittelwert = 781 ng/ml) gefunden (220). Nach einem Herzinfarkt stieg in einer Untersuchung von Birgegard et al. (28)* bei acht von neun Patienten das Serumferritin nach 24 h an, mit einem Maximum bis zu 900 ng/ml innerhalb der ersten Woche, jedoch ohne Korrelation zur Größe des Infarkts. Des weiteren verändern sich die Ferritinspiegel parallel zu den Schilddrüsenhormonwerten, meist jedoch inner-

halb des Normbereiches (264). Dies widerspricht einer früheren Auffassung von Macaron und Macaron von einer Hyperferritinämie bei Hyperthyreose (196). Interessanterweise fand man bei 13 von 15 Patienten mit AIDS (aquired immune deficiency syndrome) und bei 4 von 15 Patienten mit ARC (AIDS related complex) signifikant erhöhte Serumferritinwerte; eine Rolle des Ferritins in der Pathogenese der zellvermittelten Immunschwäche wird diskutiert (115).

Ergebnisse über saure Ferritine bei nichtmalignen Erkrankungen sind selten:

Sehr hohe saure Ferritinspiegel fanden Niitsu et al. (220) und Hazard/Drysdale (126) bei Hepatitis und Pankreatitis (113 bzw. 740 ng/ml). Jones und Mitarbeiter (156) fanden 1977 mit einem polyklonalen Anti-Herzferritin-Antikörper (Normalwert 10 ng/ml) einen Anstieg saurer Ferritine bis 43 ng/ml bei Myokardinfarkt, bis 36 ng/ml bei transfusioneller Eisenüberladung und bis 23 ng/ml bei IH (=Mittelwerte). 52% der Patienten mit β -Thalassämia major wiesen bei Arosio et al. (16) mit einem polyklonalen Anti-HeLa-Ferritinantikörper erhöhte Ferritinwerte von im Mittel 90 ng/ml auf.

Ein spezifischerer polyklonaler Anti-HeLa-Ferritin-Test konnte 1980 bei Jones und Mitarbeitern (160) nur noch bei 3 von 16 Myokardinfarktpatienten erhöhte Werte bis maximal 17 ng/ml und bei IH Spiegel bis 5,5 ng/ml aufspüren.

Mit dem monoklonalen 2A4-Anti-Herzferritin-Antikörper waren in nur 20% aller Normal- und Patientenseren mit Eisenüberladung saure Ferritine nachweisbar. Die Anstiege bei anderen Erkrankungen waren im Vergleich zu den alkalischen Ferritinwerten sehr gering, am höchsten bei Eisenmangelanämie (maximal 84 bzw. 54 ng/ml) (48, 55), bei Entzündung (maximal 79 ng/ml) und bei Herzinfarkt (37 ng/ml) (55).

TABELLE 1

VERÄNDERUNGEN DES MENSCHLICHEN
SERUMFERRITINSPIEGELS

NORMALWERTE:	MÄNNER: 25- 307 ng/ml	} Mittelwert aus fünf Publikationen
	FRAUEN: 14- 176 ng/ml	

ABFALL: EISENMANGEL

ANSTIEG: I) IDIOPATHISCHE HÄMOCHROMATOSE

II) HÄMOSIDEROSE BEI

1. ANÄMIEN MIT EISENVERWERTUNGSSTÖRUNGEN

- sideroachrestische Anämie
- Thalassämia major
- Bleianämie
- Pyridoxinmangelanämie

2. HÄMOLYTISCHE ANÄMIEN

- korpuskuläre hämolytische Anämien
- serogene hämolytische Anämien
- toxisch-hämolytische Anämien

3. HYPERCHROME ANÄMIEN

4. APLASTISCHE ANÄMIEN

5. EXOGENE EISENZUFUHR

III) ERKRANKUNGEN MIT LEBERZELLSCHÄDIGUNG

IV) MYOKARDINFARKT

V) ENTZÜNDLICHE ERKRANKUNGEN/ INFEKTIONEN

VI) MALIGN E ERKRANKUNGEN (siehe Tabelle 2)

maligne Erkrankungen

Ursachen für Serumferritinerhöhungen bei malignen Erkrankungen können sein eine Zunahme der Eisenspeicher im RES, der sogenannte "RE Eisenblock" (155), eine verminderte Erythrozytenlebenszeit, eine beeinträchtigte Erythropoese, entzündliche Begleitreaktionen, Ferritinfreisetzung aus geschädigtem Gewebe oder eine Ferritinsynthese und -freisetzung durch die Tumorzellen selbst. Dieses letzte Phänomen hatten Lee und Richter (175) bei Lebertumoren von Ratten und Richter (248) bei Hela-Tumorzellen beschrieben.

Wissenschaftler versuchten mehr als zwei Jahrzehnte lang diese "Tumorferritine" in Patientenserum als spezifische Tumormarker aufzuspüren, zumal Hazard und Mitarbeiter (126, 127) schon früh Hinweise auf zusätzliche, immunologisch abgrenzbare, saure Isoferritine in diesem Zusammenhang gefunden hatten.

1. Leukämie

Parry et al. (234) und Matzner et al. (204) fanden bei über 90% der Patienten mit AML und ALL erhöhte Ferritinwerte im Serum bis 2500 ng/ml, welche bei Remission mit einer Latenz von mehreren Monaten wieder in den Normbereich abfielen. Die Konzentration während der Remission korrelierte jedoch nicht mit deren Dauer (234). Jones et al. (155) berichteten über zehnfach erhöhte Ferritinmittelwerte bei Patienten mit AML im Vergleich mit Normalpersonen. Da bei dieser Erkrankung jedoch kein RE-Eisenblock besteht und die Ferritinwerte nur mit der Gesamtzahl der weissen Blutzellen korrelierten, tendierten sie zu einer Ferritinproduktion durch die Tumorzellen selbst. Auch andere Untersucher schlossen aus dieser Beziehung und der erhöhten Ferritinsynthese in leukämischen und Hodgkin-Lymphozyten in vitro (280) auf eine aktive Sekretion von Ferritin durch die malignen Zellen (294).

Bei der CML und CLL fanden Pagé et al. (228) in 77 bzw. 52% der Fälle erhöhte Ferritinwerte, nach Lang et al. (169). bleibt bei CML-Patienten das Ferritin in der chronischen Phase normal und steigt erst mit zunehmender Beeinträchtigung der Erythropoese unabhängig von der Blastenzahl an.

Niitsu et al. (219) hatten 1976 bei einem CML-Patienten mittels Isoelektrofokussierung zusätzliche saure Banden entdeckt. Hazard und Drysdale (126) fanden mit einem polyklonalen Antikörper bei akuten Leukämien jedoch nur leicht erhöhte Werte bis 165 ng/ml (Referenzbereich bis 100 ng/ml). Anderen Untersuchern (70, 116) gelang der Nachweis solcher Tumorferritinmuster ebenfalls nicht. Jones et al. (156) stießen mit einem polyklonalen Herzferritin-Antikörper auf nur gering erhöhte Werte für saures Ferritin in Tumorseeren (bis 79 ng/ml bei akuten Leukämien bei Referenzbereich kleiner 10 ng/ml), wobei der relative Anstieg gegenüber dem alkalischen Ferritin am größten bei Myokardinfarkt und Brustkrebs war.

Mit spezifischeren polyklonalen anti-Hela-Ferritin-Antikörpern fielen die sauren Ferritinwerte derselben Untersucher 1980 noch niedriger aus: nur 37% der ALL-Patienten hatten Werte über dem Normalbereich (maximal 14,5 ng/ml), 40% der AML-Patienten wiesen im Serum 2-41 ng/ml saures Ferritin auf. Der Anteil stieg bei einem Rückfall nach Remission auf 79% an (2-33 ng/ml; Referenzbereich kleiner 2 ng/ml) (160), dabei war jedoch auch das alkalische Ferritin mit im Mittel 2040 ng/ml stark angestiegen. Es bestand außerdem kein Zusammenhang zwischen Rückfallraten und Hela-Ferritinerhöhungen.

2. maligne Lymphome

Reissmann und Dietrich fanden schon 1956 mit einem relativ unsensitiven Immunpräzipitationstest Ferritin im Serum von Patienten mit M. Hodgkin (244); viele Untersucher bestätigten später diese Befunde (27, 146), Jones et al. (155) sahen die Hauptursache dabei im RES-Eisenblock. Nach Matzner et al. (204) weisen alle Hodgkin-Patienten mit Stadium III und IV erhöhte

Serumferritinwerte auf, jedoch ohne Unterschiede zwischen den verschiedenen histologischen Subtypen. Das Serumferritin bei Non-Hodgkin-Lymphomem zeigt hingegen eine deutliche Abhängigkeit von Histologie und klinischer Aktivität, nicht aber vom Differenzierungsgrad: Die höchsten Werte wurden bei aktiven Lymphomen vom histiozytären Typ (mehr als 10 000 ng/ml), normale oder leicht erhöhte beim lymphozytären Zelltyp gefunden. Als Kriterium der Ferritinproduktion in den Tumorzellen selbst sahen Watanabe und Niitsu (274) die Nachweisbarkeit menschlicher Ferritine im Serum einer Maus nach Implantation eines menschlichen Tumors an. Dörner und Mitarbeiter konnten des weiteren zeigen, daß T-Lymphozyten aus der Milz von M.Hodgkin-Patienten sehr saure Ferritine produzieren und sezernieren (86).

Auf der Suche nach diesen fanden Hazard und Drysdale sehr hohe Konzentrationen (126), Cazzola und Mitarbeiter (50) konnten in 94% ihrer Patienten mit M. Hodgkin erhöhte Werte für saures Ferritin bis 1000 ng/ml (Mittelwert 103 ng/ml; Normalbereich bis 41 ng/ml) messen, welche unabhängig vom Eisenhaushalt waren und sich ein bis zwei Jahre nach kompletter Remission normalisierten. 1985 ergaben Tests derselben Untersucherguppe mit einem monoklonalen Antikörper nur bei 11 von 18 Patienten leicht erhöhte Spiegel an saurem Ferritin bis maximal 40 ng/ml (1,5 bis 16 ng/ml Referenzbereich) (55), wobei eine positive Korrelation zu den alkalischen Meßwerten bestand.

Bezwoda et al. (26) sehen nach wie vor als Hauptursache für die Parallelität zwischen Ferritinwerten (kommerzieller Assay) und Tumorstadien 1A bis 4B eine Umverteilung des Körpereisens in die Eisenspeicherorgane, eine unspezifische entzündliche Reaktion, Freisetzung von Ferritin aus geschädigten Leberzellen und eine verminderte Ferritinclearance bei Leberinfil-

tration an, zumal auch Jacobs 1984 eine Ferritineigenproduktion der Tumorzellen in Frage gestellt hatte (153).

3. hepatozelluläres Karzinom (PLC)

Über erhöhte Serumferritinspiegel bei diesem Karzinom berichteten sehr viele Untersucher: Kew und Mitarbeiter fanden neben diesen Erhöhungen eine negative Korrelation zwischen Ferritin und AFP (Alphafetoprotein) (162). Nakano (214) und Tatsut und Mitarbeiter (265) sahen deshalb eine besondere Bedeutung in der gleichzeitigen Serumferritin- und AFP-Bestimmung zur Erhöhung der Sensitivität für AFP-negative Tumoren, z.B. auf dem Boden einer alkoholischen Leberzirrhose oder bei einem Tumordurchmesser kleiner 3 cm .

Saure Isoferritine im Serum eines Patienten mit PLC entdeckten 1975 Powell und Mitarbeiter (233). Auch Hazard und Drysdale (126) fanden sie, ebenso wie Niitsu et al. (218, 220), hier sogar mit einem Mittelwert von 1086 ng/ml. Die Ergebnisse von Jones et al. (160) lagen mit Werten bis 28 ng/ml bei 3 von 9 Patienten erheblich niedriger, monoklonale Antikörper konnten überhaupt nur in 3 von 12 Fällen mit Lebererkrankungen leichte Erhöhungen bis 14 ng/ml für saure Ferritine nachweisen (55).

4. andere Karzinome

Erhöhungen der Serummittelwerte von 57 auf 97 ng/ml bei Mam-
mafrühkarzinomen fanden Jacobs et al. (147), die Ferritinwer-

te unterschieden sich signifikant in Abhängigkeit vom Staging des Mammakarzinoms (N₀ kleiner N₁ kleiner M₁) (206). Saure Ferritine bis 800 ng/ml wiesen Hazard und Drysdale (126) nach, Jones und Mitarbeiter fanden mit ihrem frühen polyklonalen Herzassay nur geringe Erhöhungen (maximal 33 ng/ml) (156), mit ihrem spezifischeren Hela-Assay in 25% der frühen Mammakarzinomstadien Werte bis 17 ng/ml, in 50% der fortgeschrittenen Erkrankungen Anstiege bis 53 ng/ml (Referenzbereich kleiner 2 ng/ml) (160). Allerdings wiesen auch 14% der Frauen mit benignen Knoten der Brust geringfügige pathologische saure Ferritinwerte auf.

Weitere Tumoren mit Serumferritinerhöhungen waren Lungenkarzinom (144, 113), kleinzelliges Bronchialkarzinom (maximal 5300 bzw. 1329 ng/ml bei Frauen und Männern) (69), Pankreaskarzinom (schlechte Abgrenzbarkeit gegen chronisch rezidivierende Pankreatitis) (220, 144), metastasierendes Magenkarzinom (144, 8), Burkitt-Lymphom 30), Nierenzellkarzinom (211) (überwiegend alkalische Ferritine), Zervixkarzinom (145) (Mittelwert 190 bzw. 238 ng/ml bei Stadium III bzw. IV; Kontrollpersonen 35 ng/ml), Keimzelltumoren (187, 109) und maligne Histiozytose (bis 65 000 ng/ml) (94).

Patienten mit Neuroblastom zeigten im Stadium III in 37% und im Stadium IV in 54% der Fälle erhöhte Serumferritinwerte, die Prognose der Kinder war bei normalem Spiegel im Stadium III deutlich besser als bei erhöhtem (120). Patientenserum enthielten saure Ferritine bis 40 ng/ml (normal 12 ng/ml), allerdings war das Verhältnis sauer/alkalisch über alle Stadien der Krankheit konstant bei 0,1 (119).

Hazard und Drysdale (126) fanden bei Mamma-, Pankreas-, Leberzell-, Gallenblasen-, Kolon- und Magenkarzinom stark erhöhte Werte für die sauren Ferritine (bis 2700 ng/ml), welche sogar jeweils über den alkalischen lagen. Auch die Untersuchun-

gen von Niitsu und Mitarbeitern (22o) ergaben für Leber-, Lungen- und Magentumoren saure Ferritinmittelwerte von 1086, 356 bzw. 118 ng/ml. Spätere, verbesserte polyklonale Assays erbrachten bei Arosio et al. (16) bei 27% der Patienten mit Lungenkarzinom und 34% mit Kolonkarzinom Mittelwerte zwischen 50 und 100 ng/ml bei einem Normalbereich bis 44 ng/ml. Spezifischere Tests von Jones (156, 160) wiesen neben den geringen Erhöhungen bei Mammakarzinom und Leukämien (s.o.) bei Magen-, Pankreas-, Ösophagus- und Lungenkarzinom keine Werte über 6 ng/ml nach. Monoklonale Assays fanden bisher nur bei M. Hodgkin-Patienten eine verwertbare Vermehrung saurer Ferritine. Als mögliche Ursache für die Nichtnachweisbarkeit saurer Ferritine in Normalseren und die geringen Konzentrationen in pathologischen Seren werden Bindungsfaktoren in menschlichen Seren angesehen, welche mit sauren Ferritinen Komplexe bilden, die dann rasch von der Leber aus der Zirkulation entfernt werden, oder die Messung durch einen Immunoassay verhindern oder beeinträchtigen (73, 68, 55, 24). Jüngste Untersuchungen von Bellotti et al. (24) charakterisierten diesen Bindungsfaktor als Glykoprotein mit einem MG von 200 000, einem pI von 4-5 und einer elektrophoretischen Wanderung in der β_2 -Region. Proteine des Komplementsystems (C_3 und C_4) sollen an der Reaktion beteiligt sein.

Erniedrigte Serumferritinwerte

Bei einem Eisenmangel des Körpers kommt es noch vor Entwicklung einer Eisenmangelanämie zu einem Absinken des Serumferritinspiegels. Werte unter 15 ng/ml sprechen für entleerte Eisenspeicher. Die Serumferritinbestimmung, die sehr gut mit dem Knochenmarkseisen korreliert, hilft deshalb, Risikogruppen für eine solche Anämie (Kleinkinder, Schwangere) recht-

zeitig einer Eisensubstitution zuzuführen.

Besonders bei leichten Formen der Eisenmangelanämie, bei denen sowohl die Erythrozytenindices als auch Serumeisen und Eisenbindungskapazität normal sein können, ist ein Ferritinspiegel unter 40 ng/ml wegweisend (222). In der Differentialdiagnose einer Anämie ist es deshalb ratsam, die oben genannten Bestimmungen parallel zur Ferritinbestimmung durchzuführen, um eine größere diagnostische Sicherheit zu erlangen. Auf die Eisenfärbung im Knochenmark zur Abschätzung des Körper Eisens kann dabei verzichtet werden. Ein normaler Ferritinspiegel schließt allerdings wegen der vielen Ursachen für eine Ferritinerhöhung einen Eisenmangel nicht aus.

Interessanterweise ergaben Serumferritinbestimmungen bei Patienten mit Eisenmangelanämie mittels monoklonaler Antikörper bei 11 von 16 Patienten erhöhte saure Ferritinwerte bis 84 ng/ml, die höchste Konzentration, die überhaupt mit diesem hochspezifischen Test bisher gemessen wurde (55). Es war ausserdem die einzige Erkrankung, bei der die sauren die alkalischen Werte (2-12 ng/ml) überstiegen. Nach Cazzola et al. liegt die Ursache dafür eventuell in einer geringeren Konzentration von Bindungsfaktoren für saure Ferritine in den Seren solcher Patienten (68).

c) Ferritine in oder auf Blut- und Knochenmarkszellen

Das Ferritin in reifen Erythrozyten ist ein Relikt der Ferritinsynthese in Erythroblasten. Diese übernehmen das Eisen vom Plasmatransferrin, welches als zweifach beladenes Protein

("diferric transferrin") eine höhere Übertragungskapazität besitzt (135). Nicht für die Hämoglobinsynthese benötigtes Eisen wird als Ferritin gespeichert. Demnach hängt der Ferritingehalt der Erythrozyten von der Transferrinsättigung und der Hämoglobinsyntheserate ab (54). Erythroblasten enthalten ca. 2000 mal mehr Ferritin als reife Zellen, bei nur drei bis fünf Zellteilungen muß ein Teil des Ferritins während der Reifung sezerniert werden (46).

Der Anteil des sauren Ferritins nimmt zwar bei der Reifung kontinuierlich ab (152), beträgt jedoch auch in der reifen Zelle noch das Zehnfache des alkalischen Wertes (150). Über die Funktion des Erythrozytenferritins gibt es viele Theorien (siehe 2.1.6), die Hela-Typ-Ferritine sollen in frühen Erythroblasten eine aktive Rolle im Eisentransport zwischen Plasmamembran und Mitochondrien spielen (54).

Die Normalwerte liegen für alkalisches und saures Ferritin bei etwa 3-40 ag/Zelle bzw. 6-85 ag/Zelle (ag= Attogramm, $1 \text{ ag} = 10^{-18} \text{ g}$). Erhöht zeigt sich das Erythrozytenferritin bei Eisenüberladung, z.B. IH (70 facher Wert), megaloblastischer Anämie, Thalassämiesyndromen und myelodysplastischen Syndromen (bei letzteren mehr als Zeichen eines intrazellulären metabolischen Defekts), erniedrigt bei Eisenmangel (anämie) und bei Entzündungen (56), wobei das alkalische Ferritin jeweils enger mit dem Eisenhaushalt korreliert. Als Vorteil der Ferritinbestimmung in roten Blutzellen sieht Cazzola den direkten Einblick in das Gleichgewicht zwischen Eisenangebot und Bedarf für die Erythropoese an, unbeeinflusst durch andere pathologische Vorgänge im Organismus, die die Nützlichkeit des Serumferritinwertes begrenzen (z.B. Gewebnekrosen oder gleichzeitiges Auftreten von Anämie und Entzündung, z.B. bei rheumatoider Arthritis) (56). Über die Bedeutung des Ferritins auf der Zelloberfläche der Erythroblasten ist noch sehr wenig bekannt (152).

Weisse Blutzellen

Monozyten enthalten mehr Ferritin (38,4 fg/Zelle; fg= Femtogramm, entspricht 10^{-15} g) als Lymphozyten (8,6 fg/Zelle) und polymorphe Leukozyten (3,2 fg/Zelle), die sauren Isoferritine überwiegen in Monozyten (2,8: 1) und Lymphozyten (2:1) (159). Nach Saab und Mitarbeitern ist das Monozytenferritin bei Thalassemie und Transfusionssiderose sehr stark erhöht, die relativ geringen Anstiege bei der IH deuten sie als Hinweis auf einen gestörten Ferritinmetabolismus in RES-Zellen bei dieser Erkrankung (256), ein Ergebnis, das von anderen Autoren nicht bestätigt werden konnte (151,20).

Lymphozyten von M. Hodgkin- und Leukämiepatienten synthetisieren und sezernieren mehr Ferritin als normale Lymphozyten (256, 280). Dörner et al. (86) konnten 1980 zeigen, daß T-Zellen mehr saure Ferritine produzieren und sezernieren als B-Zellen. Dementsprechend prägen Zellart und -reife, Proliferation und anatomische Lokalisation das Isoferritinmuster in Lymphozyten (268):

In allen Geweben und Flüssigkeiten mit hohem T-Zellanteil (Thymus, T-lymphoblastische Lymphome, periphere Blutlymphozyten (PBL)) überwiegen die sauren Ferritine, jedoch mit fallender Tendenz in dieser Reihenfolge, da die Thymozyten die unreifsten Zellen sind. B-Zellymphome enthalten überwiegend Milztyp-Ferritin, jedoch in höherer Konzentration als die PBL. Lymphoide Zellen aus normalen und M. Hodgkin-Lymphknoten unterscheiden sich weder in der Konzentration noch im Verteilungsmuster der Isoferritine (268). Über die Funktion saurer Ferritine aus Monozyten und Makrophagen wurde schon in 2.1.6 berichtet.

66% der peripheren Monozyten, 75% der B-Lymphozyten, aber nur 6% der T-Lymphozyten tragen signifikante Mengen von Ferritin

auf der Zelloberfläche (74). Bei Patienten mit M. Hodgkin ist der Anteil ferritintragender zirkulierender Lymphozyten, vor allem der T-Zellen (152), mit zunehmender Schwere der Erkrankung zunehmend erhöht (166), verbunden mit einer verminderten E-Rosettenbildung dieser Zellen (= Zeichen für verminderte Immunaktivität). Auch beim Neuroblastom zeigten 12 von 17 Patienten mit Stadium IV (mit Knochenmetastasen) und Hyperferritinämie eine positive E-Rosettenhemmung der Lymphozyten, in vitro nachvollziehbar an normalen Lymphozyten nur durch Inkubation mit Hela- oder Neuroblastomferritin (119). Man schließt daraus auf eine Hemmung des Immunsystems durch zirkulierende oder zellständige Ferritine/Isoferritine, wodurch das Wachstum des Tumors begünstigt werden kann (208). In der Tat hatten Patienten mit Stadium III- oder IV-Neuroblastomen und erhöhten Serumferritinwerten in einer Studie von Hann und Mitarbeitern (119) eine schlechtere Prognose als solche ohne Ferritinerhöhungen.

Eine Untersuchung auf ferritintragende Lymphozyten scheint auch bei Mammafrühkarzinom (Stadium I und II) oder präkanzerösen Veränderungen, bei Non-Hodgkin Lymphomen und beim Lungenkarzinom hilfreich zu sein (209, 262). Plattenepithelkarzinome von Kopf und Hals, Kolon- und Lungenkarzinome zeigten zwar ebenfalls erhöhte Spiegel dieser Lymphozyten, es konnte jedoch weder eine Korrelation zum klinischen Stadium noch zur Menge der E-Rosetten bildenden Lymphozyten nachgewiesen werden (232).

TABELLE 2

SAURES UND ALKALISCHES SERUMFERRITIN BEI MALIGNEN ER-
KRANKUNGEN

TUMOR	SAURES FERRITIN	ALKALI - SCHES FERRI- TIN	SAURES FERRI- TIN	ALKALI- SCHES FERRITIN	LITE- RATUR
	BEREICH (ng/ml)		MITTELWERT ng/ml		
ALL	<2-14,5 (37%)	49-4945 7- 610 ⁴⁾	148	19235 426 2512 ¹⁾ 363 ²⁾ 138 ³⁾ 636 ¹⁾ 133 ⁴⁾	(126) (160) (228) (204) (164)
AML	<2-41 (40%) ¹⁾ <2-16 (48%) ⁴⁾ <2-33 (79%) ⁵⁾	155-2200 66-8380 27-6126 81-8815	135	2344 550 ²⁾ 589 1771 674 566 2040 503	(204) (155) (126) (160) (228)
CML				128 ⁶⁾ 1200 ⁷⁾ 295 1905 ⁸⁾ 287	(169) (204) (228)
CLL	25-880			7233 93 234 321	(30) (204) (155) (228)

TUMOR	SAURES FERRITIN	ALKALI- SCHES FERRI TIN	SAURES FERRI- TIN	ALKALI- SCHES FERRITIN	LITE- RATUR
	BEREICH (ng/ml)		MITTELWERT (ng/ml)		
M. HODGKIN	< 1,5- 40 (61%)	34-4200			(55)
				3960	(30)
Stadium I		38- 600		243	(87)
		63- 103		80	(26)
		63-2715		420	(146)
Stadium II		28- 235		105	(87)
		319- 451		379	(26)
		25-2238		486	(146)
Stadium III		128- 470		378	(87)
		86- 901		278	(26)
		18-4828		602	(146)
Stadium IV		95-1700		831	(87)
		1156-3712		2072	(26)
		70-7303		1107	(146)
Stadium III+ IV				1380	(204)
				316 ⁹⁾	(204)
				74 ¹⁰⁾	(204)
	30-1000 ¹⁾	12-2100	103	175	} (50)
	21- 570 ¹⁰⁾	14- 230	72	67	
	25- 750 ⁵⁾	31-1268	131	143	
M. NON-HODG- KIN		39- 90		181	(228)
				61	(155)
- histiozytisch:				2512	} (204)
- lymphozytisch:				170	
- gemischt:				372	
HEPATOZELLU- LÄRES KARZI- NOM				423 441 ¹¹⁾	(214)

TUMOR	SAURES FERRITIN	ALKALISCHES FERRITIN	SAURES FERRI- TIN	ALKALI- SCHES FERRITIN	LITE- RATUR
	BEREICH (ng/ml)		MITTELWERT (ng/ml)		
HEPATOZELLU- LÄRES KARZI- NOM		30-25600	1086 850	387 1233 800 585 560 ¹²⁾	(265) (30) (162) (220) (126) (160)
	2- 28 (33%)	300-15000			
LUNGENKARZI- NOM	40-130 (27%) 2- 3 (20%)	80- 1100 25- 1190	1750 ¹²⁾ 356	630 322	(126) (16) (160) (220)
Stadium I				784 (83%)	
Stadium II				428 (50%)	(144)
Stadium III				511 (54%)	
KLEINZELLIGES BC		13- 1329 134- 5300		660 ♂ 306 ♀	(69)
MAMMAKARZINOM	140-800	50- 330		687	(126) (30)
Frühstadium	< 2-17 (25%)	3- 1313		48 97 199 102 ¹³⁾	(160) (147) (199) (206)
Spätstadium	< 2-53 (50%)	6- 8360		132 671 288 ¹⁴⁾	(160) (199) (206)
BENIGNE KNO- TEN D. BRUST	< 2-15	4- 322			(160)
MAGENKARZINOM	< 2- 6 (17%) 285-1750	25- 365 118- 750	118	110	(160) (126) (220)
ÖSOPHAGUSKAR- ZINOM	< 2	48- 183			(160)

TUMOR	SAURES FERRITIN	ALKALISCHES FERRITIN	SAURES FERRI- TIN	ALKALI- SCHES FERRITIN	LITE- RATUR
	BEREICH (ng/ml)		MITTELWERT (ng/ml)		
KOLONKARZINOM	10-100 (34%)	10-12000	1500	220 ¹²⁾	(16) (126)
PANKREASKAR- ZINOM			< 2 1000	265 ¹²⁾ 460 453	(160) (126) (221)
Stadium I				250 (50%)	(220)
Stadium II				476 (67%)	
Stadium III				762 (75%)	
HODENTUMOREN mit Metasta- sen				2200	(187)
TERATOBLASTOM			1000	1550	(126)
MALIGNE HI- STIOZYTÖSE		1140-65000 (während DIC)			(94)
BURKITT-LYM- PHOM				1234	(30)
CERVIX-KARZI- NOM					
Stadium I		2- 500		116	(145)
Stadium II		15- 486		156	
Stadium III		25- 2220		149	
Stadium IV		26- 370		128	
NEUROBLASTOM					
Stadium I				55	(120)
Stadium II				64	
Stadium III				257	
Stadium IV				320	

TABELLE 2:

- 1) bei Vorstellung
- 2) > 6 Monate Remission
- 3) > 1 Jahr Remission
- 4) in Remission
- 5) im Rückfall
- 6) normale Erythropoese
- 7) gestörte Erythropoese
- 8) Blastenschub
- 9) inkomplette Remission
- 10) komplette Remission
- 11) mit Metastasen
- 12) Einzelbestimmung
- 13) ohne Fernmetastasen
- 14) mit Fernmetastasen

2.1.8 Ferritinisolierung

Das bei mindestens -20°C (184, 16, 286) gelagerte Gewebe wird nach dem Auftauen zuerst zerkleinert und dann in ein- einhalb bis vierfachem Volumen schwacher Salzlösungen homogenisiert (198, 162).

Dann erfolgt bei der Mehrzahl der Untersucherguppen eine Hitzefällung des Homogenats (213, 111, 88, 182, 286, 160, 162) bei $70-60^{\circ}\text{C}$ für zehn Minuten, welche in gleicher Weise bei Extraktionen aus Serum (287), Zellkulturen (160) oder Blutzellen (156, 272) durchgeführt wird. Das Ferritin verbleibt dabei aufgrund seiner Hitzestabilität im Überstand. Wegen möglicher Denaturierung, vor allem saurer Ferritinateile, verzichteten einige Untersucher jedoch auf diesen Schritt (172, 100, 226, 271, 220).

Nach einer ersten Zentrifugation folgt auf eine saline Extraktion durch Ansäuern auf pH 4,6 oder 4,8 über Nacht eine zweite Zentrifugation (282, 162). Aus dem Überstand kann dann mit 50 bis 70%igem Ammoniumsulfat (z.B. langsames Zugabe von $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ bis 55% Sättigung, pH auf 6,0 einstellen, Inkubation über Nacht bei 4°C , Zentrifugation bei 1500g für 30 Minuten, Resuspension des Präzipitats mit Aqua dest., bei zweimaliger Wiederholung des Vorgangs (139, 160, 282, 195, 162, 100) das Ferritin ausgefällt und nach Resuspension des Präzipitats mit Cadmiumsulfat kristallisiert werden (z.B. 25%ig für 7 Tage (282)). Herzferritin kristallisiert nur mit PEG 4000 oder 6000 oder 2-Methyl-2,4 pentanediol (17). Eine Methode der Ferritinanreicherung neben der Ammoniumsulfatfällung ist die Eliminierung niedermolekularer Proteine mittels Ultrafiltration (z.B. Diaflo XM-300, Ausschlußgrenze 3×10^5 Daltons (230)).

Anstelle der Behandlung mit Cadmiumsulfat (139) kann auch sofort mit der Säulenchromatographie (s.u.) oder der präparativen Elektrophorese begonnen (282), oder eine präparative Ultrazentrifugation (z.B. 100 000g für 4h (286)) des Extraktes zwischengeschaltet werden (235, 286, 295, 235). Drysdale und Munro (88) führen vor der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung eine Adsorption an eine Carboxymethylzellulose-Säule zur Entfernung kontaminierender Proteine durch. Die Ammoniumsulfatfällung kann außerdem auch ganz unterbleiben (271, 282).

Die weitere Reinigung läuft dann über Gelfiltration (Sephadex G 200 (210, 198), Sephacryl A 200 (162), Sephacryl S 200 (11), Sepharose 6B (160, 271, 282), Ultrogel ACA 34 (184), Sephadex G.100/150 (184, 203)) mit Auftrennung nach dem Molekulargewicht und/oder Anionenaustauschchromatographie (z.B. Sephadex A 50 (286), Whatman CM 52 (162), DEAE Sepharose 6B (286, 198, 18, 165)), welche die Proteine mit Hilfe eines Salzgradienten nach ihrem isoelektrischen Punkt auf-trennt (z.B. NaCl-Gradient von 0-0,45M).

Bei der Immunaффinitätschromatographie mit Ferritinantikörper-gekoppelter CNBr-aktivierter Sepharose 4B wird das Antigen nach Bindung an die Säule mittels chaotroper Ionen (z.B. 3 molarer KSCN-Lösung) eluiert und dabei stark angereichert.

Weitere leistungsfähige Reinigungsmethoden sind die präparative Gradienten-Gelelektrophorese in Polyacrylamid (282, 195, 17), die Dichtegradienten-Zentrifugation (Auftrennung nach Eisengehalt bzw. Abtrennung von Apoferritin) (216, 226), die HPLC (= high-performance-liquid-chromatographie) (107), die Immunelektrophorese (40) und die präparative Isoelektrofokussierung (IEF). Die Trennung von Mono- und Polymeren ist durch die Chromatographie über Sepharose 6B oder Biogel A möglich.

Die Reinigung von Zellferritinen (Hela-Zellen, Retikulozyten, Monozyten) erfolgt nach Anreicherung (Monozyten z.B. durch Zentrifugation über einen Percoll- oder Ficoll-Dichtegradienten (159, 268)) und Lyse der Zellen durch Ultraschall (160), mehrmaliges schnelles Frieren und Auftauen oder Antikörper- plus Komplementzusatz nach dem gleichen Schema.

Zur Darstellung und Gewinnung von Isoferritinen eignen sich neben der selektiven Kristallisation (s.o.) besonders die Anionenaustauschchromatographie, die IEF in Polyacrylamid- oder Sucrosegradienten-Gelen (198) und die Chromatofokussierung mit einem pH-Gradienten (101), zur Darstellung der Untereinheiten (Spaltung siehe 2.1.2) die SDS-Gradienten-Gel-elektrophorese und die Elektrochromatographie (224), zu ihrer Gewinnung die "reversed-phase HPLC" (63).

2.1.9 Quantitative Ferritinmessung

Erst durch die Entwicklung hochempfindlicher Immunoassays gelang es, in den Seren von Normalpersonen oder Eisenmangelpatienten Ferritin überhaupt nachzuweisen und exakt zu messen.

Beim RADIOIMMUNOASSAY (RIA) (199), einem kompetitiven Assay, konkurriert eine bekannte Menge ¹²⁵Jod-markierten Antigens (Tracer) mit dem Ferritin der Probe/des Standards in einem Reaktionsgefäß um die Bindungsstellen an einem spezifischen poly- oder monoklonalen Antikörper. Die löslichen Antigen/Antikörperkomplexe werden dann mit einem zweiten Anti-IgG-Antikörper gefällt und abzentrifugiert. Die gemessene Radioaktivität im Präzipitat verhält sich umgekehrt proportional zur Ferritinmenge der Probe.

Das Ergebnis einer Testung liegt bei vielen RIA's erst am dritten Tag vor (199). Durch Zusatz von Polyethylenglykol (PEG) zum zweiten Antikörper kann die zweite Inkubation von 24h jedoch entfallen (194). Führt man die erste Inkubation bei 37°C und die Fällung mit einem Festphasen-Antikörper (gekoppelt an CNBr-aktivierte Zellulose) durch, so verkürzt sich die Testdauer auf vier Stunden (114). Der Vorteil des RIA ist seine hohe Sensitivität (0,25 ng/ml (266)) und gute Reproduzierbarkeit. Der Nachteil ist, daß sich durch Nichtübereinstimmen von Tracer, Standard und gemessenem Antigen verfälschte Werte ergeben können.

Der IMMUNORADIOMETRISCHE TEST (IRMA) ist ein nicht-kompetitiver Assay, bei dem der A n t i k ö r p e r radioaktiv markiert wird, was technisch einfacher ist. Der 1-Seiten-Assay (1S-Assay) geht auf Addison et al. (1) zurück: Ein radioaktiver Ferritinantikörper im Überschuß reagiert mit dem Standard- oder Probenferritin, gebundener und nichtgebundener Antikörper werden mittels eines Immunoadsorbens (z.B. Ferritin, gebunden an Nitrozellulose), durch Ultrafiltration (269) oder durch Präzipitation mit Rivanol (12) getrennt. Ein Vorteil gegenüber dem 2-Seiten-Assay ist der geringere Verbrauch von Antikörper.

Das Prinzip des 2-Seiten-Assay oder "sandwich assay" nach der Methode von Miles und Hales (207) beinhaltet die Kopplung des nichtmarkierten Antikörpers an eine "feste Phase" (Wand von Polyethylenröhrchen, Silikongummi-Teilchen, Polystyrol-Kügelchen oder Polyvinyl-Mikrotiterplatten), die Zugabe von Probe/Standard und die Bindung des im ersten Schritt gebundenen Antigens durch einen zweiten, radioaktiv markierten Ferritinantikörper. Die gemessene Radioaktivität verläuft proportional zur Ferritinmenge in der Probe.

Ein Nachteil des IRMA ist der sogenannte "high dose hook effect", ein Abbiegen der Standardkurve nach unten im oberen

Meßbereich, bedingt durch ein schlechteres Bindungsverhalten des Antigens an den Festphasenantikörper bei hohen Antigenmengen. Dadurch kann ein hoher Ferritingehalt fälschlicherweise zu niedrig gemessen werden (207, 112). Viele Autoren verneinen jedoch diese Erscheinung bei ihren Assays (93, 253a). Vermindert werden kann diese Störung durch mehrfaches Waschen nach dem ersten Schritt (44). Trotzdem werden Serumverdünnungen empfohlen. Die Sensitivität ist mit 0,2 ng/ml sehr gut (263), allerdings fanden einige Autoren eine nicht zufriedenstellende Dosis/Antwort-Beziehung oder Abweichungen bei Verdünnungsreihen bei dieser Art von Assay (93, 253a). Auch der monoklonale Test mit dem 2A4-Antikörper ist ein IRMA.

Der ELISA (enzyme-linked immunoradiometric assay) ist ebenfalls ein nicht-kompetitiver Assay, der markierte zweite Antikörper wird hierbei jedoch durch einen enzymgebundenen ersetzt (Enzym z.B. alkalische Phosphatase, β -D Galaktosidase, Peroxidase). Die Zugabe des Enzymsubstrates bewirkt schließlich eine quantifizierbare Farbreaktion. Der Test kann auch auf Mikrotiterplatten, welche mit dem ersten Antikörper beschichtet wurden, ablaufen (188). Er kann durch PEG beschleunigt werden (229), ist sehr sensitiv (0,25 ng/ml (275)), einfach-teilweise automatisiert- durchführbar, billig, erfordert nicht die Arbeit mit radioaktivem Material, und die Reagenzien sind langlebig. Allerdings gibt es auch hier einen "hook effect" (85).

Eine weitere Meßmethode stellt der PACIA (particel counting immunoassay) dar, bei dem Ferritinantikörper auf Polystyrenteilchen durch Ferritin agglutiniert werden (186).

In der Sensitivität scheinen die neueren ELISA's (2,3 pg/ml (138)) der radiometrischen Assays etwas überlegen zu sein. Die oft starken Abweichungen in den Meßwerten untereinander

erklären sich durch die unterschiedliche Spezifität der Antikörper, die Heterogenität der Serumferritine und Standards und die verschiedenen "Testdesigns".

2.2. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

2.2.1 METHODIK

2.2.1.1 Analytische Verfahren

Gesamteiweißbestimmung nach Lowry (192) (modifiziert)

Prinzip:

Protein reagiert in alkalischer Lösung mit Kupfersulfat zu einem farbigen Komplex. Bei Zugabe von Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz reduziert der Protein-Kupfer-Komplex das darin enthaltene Phosphomolybdat, wobei sich eine blaue Färbung entwickelt, die bei 750 nm spektralphotometrisch gemessen werden kann.

Durchführung:

Die Durchführung erfordert die Herstellung folgender Lösungen:

Reagenz A: 2% NaCO_3 in 0,1 N NaOH-Lösung + 1% SDS (Sodium-dodezylsulfat) + 0,16% K^+Na^+ -Tartrat

Reagenz B: 4% $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$

Reagenz C: 100 ml Reagenz A + 1 ml Reagenz B

Reagenz D: Folin-Ciocalteus-Phenollösung 1:1 mit Aqua dest. versetzen

Jeweils 100µl der Probe/ des Standards werden mit 500µl Reagenz C versetzt und zehn Minuten inkubiert. Nach Zusatz von 100µl Lösung D und Inkubation von 30 Minuten liest man die Ex-

tinktion bei 750 nm im Spektralphotometer ab, von allen Meßwerten wird die Extinktion eines Leerwertes subtrahiert. Die Eichkurve wurde mit gereinigten Ferritinen (siehe 2.2.2.1) in einer Konzentrationsreihe von 50 bis 1000 µg/ml Protein erstellt.

Zweidimensionale Doppeldiffusion nach Ouchterlony

Für die zweidimensionale Doppelimmundiffusion (227) wurden Objektträger mit 2%igem DIFCO-Agar¹⁾ mit Cialit-Zusatz beschichtet. Mit speziellen Stanzen²⁾ wurden um ein zentrales Reservoir drei bis acht weitere Reservoirs (Ø 2-4mm, Inhalt 10-15 µl) geschaffen, welche mit den jeweiligen Antigen- bzw. Antikörperlösungen beschickt wurden. Nach einer Diffusionszeit von etwa 24 Stunden folgte eine Wässerung in physiologischer Kochsalzlösung (24 h). Danach wurden die Objektträger getrocknet, mit Azokarmin gefärbt und in einer Eisessig-Methanollösung (1:10) entfärbt. Diese Methode diente zur Reinheitsprüfung verschiedener Proteinpräparationen, zur Vor-testung der Spezifität von Antikörpern und zur Überprüfung der Kreuzreaktivität von Antigenen.

Qualitative Elektrophorese in Polyacrylamid- und SDS-Gradientengelen

1. horizontale Polyacrylamid-Elektrophorese

Die Auftrennung der Proteinfractionen nach Nettoladung und Molekülgröße und -form erfolgte in 6%igen ultradünnen Polyacrylamidgelen (120mm x 250mm x 0,5mm), welche in einer Gieß-

1) Fa. DIFCO Lab., Detroit, USA

2) Fa. BOSKAMP, Hersel bei Bonn

form¹⁾ auf Plastikfolien¹⁾ polymerisiert wurden.

Die Proben (6µl; Proteinkonzentration 0,1 bis 1mg/ml) wurden direkt auf das fertige Gel in miteingegossene Proben-slots (0,1 x 8 x 2mm) aufgetragen. Der Lauf wurde in einer Multiphor-Kammer²⁾ über 2-3 Stunden (maximal 600V, 30W, 50mA) bei einer Temperatur von 10°C durchgeführt.

Nach dem Lauf wurde das Gel in 20%iger Trichloressigsäure fixiert (20 Minuten), mit einer Perchlorsäure-Coomassie-Blau-Lösung (40 ml 0,4%ige Blaulösung + 15ml konz. Perchlorsäure, mit Aqua dest auf 250ml auffüllen) angefärbt (30 Minuten) und in Methanol-Eisessig (4:1:5 Teile H₂O) entfärbt. Bei sehr geringer Proteinkonzentration der Proben oder zum Ausschluß von Probenverunreinigungen schloß sich an die Coomassie-Färbung eine für Proteine noch wesentlich sensitivere Silberfärbung an (129).

2. horizontale SDS-Elektrophorese in ultradünnen Poren-Gradientengelen

Bei sehr hohen Anforderungen an die Auflösung der elektrophoretischen Trennung und bei breitem Molekulargewichtsspektrum der Proteingemische empfiehlt sich die Auftrennung in einem Porengradientengel:

Dabei wird einer "schweren Gellösung" mit einem hohen Gehalt an Acrylamid und Glycerin während des Gießvorganges in einem speziellen Gradientenmischer¹⁾ kontinuierlich eine "leichte Gellösung" (geringer Acrylamidgehalt, kein Glycerin) zugemischt. Die Gießkassette steht dabei aufrecht und füllt

1) Fa. LKB, Bromma, Schweden

2) Fa. LKB, Bromma, Schweden; Multiphor Nr. 2117

sich von unten nach oben mit einem Gel abnehmender Dichte, d.h. in Richtung der Kathode (Auftragsstelle) nimmt die Porengröße zu. Diese Änderung der Porengröße innerhalb eines Gels übt auf das Proteingemisch einen stärkeren Siebeffekt aus als ein Gel mit gleichbleibender Porengröße.

Zur Auftrennung der Ferritinfraktionen wurde ein Gradient von 4% bis 22,5% Acrylamid verwendet. Die Herstellung der Gele, der Elektrophoreselauf und die Färbemethoden sind mit der oben beschriebenen Durchführung der konventionellen Elektrophorese identisch und folgen den detaillierten Anleitungen in den Arbeiten von Görg, Postel und Westermeier (104, 105, 106).

Qualitative Isoelektrofokussierung in Polyacrylamid- und ultradünnen Agarosegelen

Prinzip:

Die Isoelektrofokussierung ist eine Elektrophoresetechnik, bei der dem Gel eine Mischung von "Trägerampholyten" mit verschiedenen isoelektrischen Punkten zugesetzt ist. Wird ein elektrisches Feld angelegt, so ordnen sich die Ampholyte entsprechend ihres pI im Gel an, bleiben an dieser Stelle liegen und bilden Dank ihrer hohen Pufferkapazität einen stabilen, linearen pH-Gradienten im Gel.

Die Proteine in den aufgetragenen Proben werden dadurch ebenfalls nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt, d.h. sie wandern im elektrischen Feld im Gel so weit, bis sie den pH-Bereich ihres pI erreicht haben und bleiben dann an dieser Stelle liegen, weil sie dort keine elektrische Ladungsdifferenz zur Umgebung mehr besitzen.

Durchführung:

Die Auftrennung erfolgte in 5%igem Polyacrylamidgel¹⁾ mit Trägerampholyten im pH-Bereich 4-6,5 (Gelmasse: 245 x 110 x 1mm) über 2-3 Stunden in einer Multiphor-Kammer Nr. 2117¹⁾ bei 5-10°C. Aufgetragen wurden jeweils ca. 15µl einer Proteinlösung (ca. 1mg/ml). Bei einer konstanten Leistung von 10 Watt betrug die maximale Spannung 2000V, die Anfangsspannung wurde mit dem Stromstärkeregler auf 200V eingestellt. Die Spannung stieg während des Laufes auf ca. 1100V an, die Stromstärke fiel von 20mA auf ungefähr 7,5mA ab (bei 10°C).

Durch die Verwendung ultradünner Agarosegele von 0,5mm Dicke anstatt der Polyacrylamidgele konnten Auftragsmenge auf 10µl und Proteinkonzentration auf 0,05-0,8mg/ml reduziert und die Trennbedingungen für hochmolekulare Proteine verbessert werden. Die maximale Leistung betrug hier 8 W, das Spannungsmaximum 250 bis 800V und die Temperatur 10-15°C. Die Durchführung der Fokussierung, Fixierung und Färbung der Polyacrylamidgele erfolgte nach Anleitung des Herstellers (191, 284), die Arbeitsanweisung für Agarosegele wurde der Veröffentlichung von H.J. Leifheit entnommen (178).

Radioimmunoassay

1. Markierung und Reinigung des markierten Proteins

Die Markierung der gereinigten Ferritine erfolgte nach der Methode der indirekten Konjugation von Bolton-Hunter (32, 33) mit geringer Modifikation.

1) Fa. LKB, Bromma, Schweden

Prinzip:

Im ersten Reaktionsschritt wird N-Succinimidyl-3-(4-hydroxyphenyl)-propionat (NSHPP) nach der Chloramin-T-Methode (137) mit ^{125}J jodiert. Dann wird dieser Komplex (^{125}J -Bolton-Hunter-Komplex) mit dem zu markierenden Protein inkubiert, wobei die markierte Phenylgruppe des NSHPP kovalent über eine Peptidbindung an eine freie Aminogruppe des Proteins gekoppelt wird (= zweiter Reaktionsschritt).

Diese indirekte Konjugationsmethode ist für das Protein sehr viel schonender, weil dabei auf das Protein selbst das Oxidationsmittel und die Radiojodlösung nicht direkt einwirken. So konnten in einigen Fällen markierte Enzympräparationen mit voll erhaltener enzymatischer Aktivität gewonnen werden (137). Außerdem müssen die Proteine, anders als bei den gängigen direkten Markierungsmethoden, nicht unbedingt Tyrosingruppen enthalten, sondern es können bei dieser Methode auch andere Aminosäuren reagieren.

Durchführung:

Zur Markierung des Ferritins wurde fertig bezogenes, in CHCl_3 gelöstes, Bolton-Hunter-Reagenz¹⁾ verwandt.

Zuerst wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom verdunstet, Dann wurden das zu markierende Ferritin (10µg in 100µl 0,1M Boratpuffer pH 8,5) mit Eppendorfpipetten zugegeben und die Konjugationsreaktion während 30 Minuten Inkubationszeit im Eiswasserbad bei 0°C ablaufen gelassen. Anschließend erfolgte eine chromatographische Auftrennung des Reaktionsgemisches über eine Ultropac TSK G 4000 SWG hochauflösende Gelpermeationschromatographie-Säule²⁾ (27,5 x 600mm) mit einer TSK-GSWP-6-Vorsäule (27,5 x 75mm), wobei neben der Radioaktivität auch die Absorption bei 280 nm kontinuierlich registriert

1) Fa. Höchst AG, Frankfurt

2) Fa. LKB, Bromma, Schweden

wurde. Als Elutionspuffer wurde 0,05M Na-Phosphatpuffer pH 7,4 + 0,01% NaN_3 verwandt. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 0,5ml/min. bei ebenfalls 0,5ml pro Einzelfraktion. Die Fraktionen mit dem markierten Protein wurden zu Sammel-fraktionen gepoolt. Diese wurden mit Elutionspuffer bis auf 0,2 $\mu\text{Ci/ml}$ verdünnt, was etwa einer Zählrate von 30 000 counts/100 μl min. entsprach, und in 10ml-Fraktionen bei 4°C bis zum Gebrauch gelagert.

2. Testung des ersten Antikörpers (Antikörperverdünnungsreihe)

Prinzip:

Die Antikörperverdünnungsreihe dient dazu, diejenige Verdünnung des ersten Antikörpers zu ermitteln, die für den Einsatz im Radioimmunoassay geeignet ist.

Dazu wird von dem gereinigten Antikörper aus dem Serum des immunisierten Tieres eine geometrische Verdünnungsreihe (z.B. Beginn mit 1:100 oder 1:1000) hergestellt. Dann werden in einem Testansatz von diesen 10-15 Verdünnungen Probevolumina mit jeweils gleichen Mengen radioaktiv markierten Antigens ("Tracer") in einer Pufferlösung versetzt.

Als Referenzaktivität (entsprechend 100%) dienen gleiche Volumina dieses Tracers, welche ohne weitere Zusätze bleiben (=T-Werte). Die unspezifische Bindung der Aktivität, z.B. an die Wand der Polystyrolröhrchen¹⁾, wird in einem Teströhrchen ohne ersten Antikörper gemessen (=N-Werte). Nach Durchmischung und Inkubation wird zu allen Röhrchen außer den T-Werten der zweite Antikörper (Anti-Kaninchen-IgG-Serum von der Ziege)²⁾, der die löslichen Antigen/Antikörperkomplexe aus der ersten Reaktion ausfällt, zugegeben. Durch Zentrifugation erhält man

1) Fa. Boll, München

2) Fa. Behringwerke, Marburg

daraus ein Präzipitat, das die gesamte gebundene Aktivität enthält, welche im Gammazähler¹⁾ gemessen wird. Diese gebundene Aktivität ist direkt proportional zur Bindung des ersten Antikörpers an das radioaktive Antigen. Nicht gebundener Tracer wird mit dem Überstand dekantiert. Die für den Assay gesuchte Verdünnung des ersten Antikörpers ist diejenige, welche eine Bindung von 30-50% der eingesetzten Gesamtaktivität (=Total-Werte) erreicht.

Durchführung:

Es wurden immer Doppelbestimmungen in Polystyrolröhrchen (15 x 55mm) nach folgendem Pipettierschema durchgeführt:

	Totals	N-Werte	Probe
RIA-Verdünnungspuffer	--	300µl	200µl
Ferritinfreies Behringserum ²⁾	--	100µl	100µl
1. Antikörper	--	--	100µl
¹²⁵ J-Ferritin + 1/400 KS ³⁾	100µl	100µl	100µl

Mischen mit einem Vortex-Mischer⁴⁾, Inkubation bei Raumtemperatur für 16-24 Stunden

2. Antikörper	--	100µl	100µl
---------------	----	-------	-------

Mischen, Inkubation bei Raumtemperatur für 16-24 Stunden

Abb. 1: Pipettierschema der Antikörperverschüttungsreihe

1) Fa. LKB, Bromma, Schweden

2) Fa. Behringwerke, Marburg; Verdünnungsserum SO Charge N 1003

3) Kaninchenserum

4) Fa. Bender&Hobein, München

Als RIA-Verdünnungspuffer diene 0,01M Phosphatpuffer + 1% BSA + 0,9% NaCl + 0,4% EDTA-Titriplex, mit 1N NaOH auf einen pH von 8,2 eingestellt.

Der 2. Antikörper wurde 1:10 mit RIA-Puffer verdünnt. Nach der zweiten Inkubation wurden alle Röhrchen mit Ausnahme der Totals bei 3000 Upm (1000g) für 30 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, nach dem Dekantieren kopfüber zum Abtropfen auf einen saugfähigen Karton gestellt, die restliche Feuchtigkeit innen mit einem Filterpapier entfernt und die Aktivität im Präzipitat über 60 Sekunden im Gammazähler¹⁾ gemessen. Die Aktivität in den Proben wurde als prozentualer Anteil der Totalaktivität angegeben.

3. Testansatz mit polyklonalem Antikörper

Prinzip:

Die Messung des gesuchten Antigens erfolgte nach dem Prinzip der "kompetitiven Verdrängung" (siehe 2.1.9):

Im einzelnen Teströhrchen konkurrieren das Antigen aus der Probe und der Tracer (idealerweise identisches Antigen, das radioaktiv markiert ist) um die Bindungsstellen am limitierten ersten Antikörper. Je mehr Antigen die Probe enthält, desto weniger Radioaktivität erscheint am Ende im gezählten Präzipitat, da der Tracer durch das in der Probe vorhandene Antigen aus seiner Bindung am ersten Antikörper verdrängt wird.

Um diese Verdrängung des Tracers quantifizieren zu können, wurde bei jedem Testansatz eine geometrische Verdünnungsreihe nichtmarkierten Antigens bekannter Konzentration mitgemessen (=Standardverdrängungskurve). Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit wurden pro Test mehrere Kontrollserien mit

1) Wallac-1260 Multigamma II-Gammazähler, Fa. LKB, Schweden

bekannter Ferritinkonzentration mitgeführt.

Durchführung:

Der Testansatz mit Doppelbestimmungen folgte dem Prinzip der Antikörperverdünnungsreihe (s.o.), als Proben dienten jetzt jedoch Patientenserum. Je nach Spezifität des Antikörpers wurden saure oder alkalische Standards in einer Konzentration von 5-1280 bzw. 5-1000 ng/ml verwandt. Nachfolgend ist das Pipettierschema des Testansatzes im Einzelnen dargestellt:

	T-Wert	N-Wert	O-Wert	Standard	Probe
RIA-Puffer	--	300µl	200µl	100µl	200µl
Behringserum	--	100µl	100µl	100µl	--
Standardlösung	--	--	--	100µl	--
Patientenserum	--	--	--	--	100µl
Kontrollserum					
1. Antikörper	--	--	100µl	100µl	100µl
Tracer	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl

Mischen, Inkubation bei Raumtemperatur für 16-24 Stunden

2. Antikörper	--	100µl	100µl	100µl	100µl
---------------	----	-------	-------	-------	-------

Mischen, Inkubation bei R.T. für 16-24 Stunden, Zentrifugieren, Messen des Präzipitats im Gammazähler¹⁾

Abb. 2: Pipettierschema des Ferritin-Radioimmunoassay

1) Wallac- 1260 Multigamma II-Gammazähler, Fa. LKB, Bromma, Schweden

4. Testansatz mit monoklonalem Antikörper

Nach Ermittlung der Antikörperkonzentration mit der höchsten Bindung an den Tracer (ca 50%) liefen die Pipettierschritte sehr ähnlich wie beim polyklonalen RIA ab. Anstelle des zweiten Antikörpers (anti-Kaninchen-IgG) wurde hierbei jedoch Anti-Mausgammaglobulin-Tachysorb¹⁾ zur Fällung des Antigen/Antikörperkomplexes aus der ersten Reaktion verwandt. Dadurch reduzierte sich die zweite Inkubationszeit auf 30 Minuten. Abbildung 3 zeigt das entsprechende Pipettierschema:

	Totals	N-Wert	O-Wert	Standard	Probe
RIA-Puffer	--	150µl	100µl	--	100µl
Behringserum	--	100µl	100µl	100µl	--
Standard	--	--	--	100µl	--
Probe/Kontrolle	--	--	--	--	100µl
monoklonaler AK	--		50µl	50µl	50µl
Tracer	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Mischen, Inkubation bei R.T. über Nacht					
Tachysorb Glob.	--	500µl	500µl	500µl	500µl
Mischen, 30 min. Inkubation, Zentrifugation, Zählung					

Abb. 3: Pipettierschema monoklonaler Ferritin-RIA

1) Fa. Behringwerke, Marburg

2.2.1.2 Präparative Verfahren

Gewebeextraktion (Herz und Leber)

Nach langsamem Auftauen der Gewebe über Nacht bei Zimmer-temperatur wurden die Organe, nachdem Fett und grobbindege-
webige Anteile (Endokard, große Gefäßansätze, Leberpforte)
entfernt waren, zuerst mit dem Messer und dann unter Zusatz
etwa der zweifachen Menge 0,9%iger Kochsalzlösung, ca. 0,2g
NaN₃/l und 500 oookIE Trasylol (=Aprotinin) in einem Braun
Multimix¹⁾ zerkleinert. Jeweils 400ml-Portionen wurden dann
in einem Virtis-Homogenizer²⁾ (15 000 Upm, 15 min., 4°C),
anschließend je 60ml-Portionen in einem "Potter"³⁾ bei Raum-
temperatur homogenisiert. Bei letztgenannter Methode rotiert
ein motorgetriebener, teflonbeschichteter Pistill unter Druck-
und Saugbewegungen in einem Glaszylinder.

Nach einer Inkubation des Gewebestreifens von zwei Stunden bei
4°C ergab eine erste Zentrifugation mit einer Kontron-Kühl-
zentrifuge⁴⁾ (9000 U/m, 120 min.) einen Überstand und ein
Präzipitat, welches nach Zugabe von 3-5l 0,9%igem NaCl, Auf-
rühren und Inkubation von zwei Stunden erneut abzentrifugiert
wurde. Die Überstände wurden vereinigt, durch Papier- und
Stofffilter filtriert und mittels eines AMICON-Systems⁵⁾ in
einer Ultrafiltrationszelle (UF 400) über eine Ultrafiltra-
tionsmembran XM 300 (Ø 72cm, Retention bei einem Molekular-
gewicht von 300 000 Daltons) oder PM 10 (Ø 72 cm, Retention
bei 12 500 Daltons) bei 4°C auf jeweils 150-200ml eingeengt.
Teilweise wurden nochmals Zentrifugationen mit einer Tisch-
zentrifuge⁶⁾ bei 15 000 Upm bei 4°C über 60 min. zwischenge-
schaltet.

1) Fa. Braun, Melsungen

2) Fa. Cenco, Haan

3) Potter-ELVEHJEM, Typ 53022, bis 400U/m, Fa. Braun, Melsungen

4) Hermle ZK 400, Kontron Instruments, Eching bei München

5) Fa. Amicon, Oosterhautd, Holland

6) Fa. Christ, Osterode

Durch Filtration der Extrakte durch Filter abnehmender Porengröße per Hand (Glasfaservorfilter, Filter $3\mu\text{m}$, $0,6\mu\text{m}$, $0,22\mu\text{m}$) wurden noch weitere Schwebeteilchen entfernt.

Bei der zweiten Leberpräparation wurde das homogenisierte Gewebematerial einer Hitzefällung bei einer Temperatur zwischen 70°C und 75°C für genau 10 Minuten unterworfen.

Nach Abkühlung im Eiswasserbad auf 4°C liefen Zentrifugation und weitere Reinigung nach oben beschriebenen Schema ab. Die Einengung des Extraktes auf etwa $1/25$ des Ausgangsvolumens mittels des Amicon-Systems mit einem Vorratsgefäß für 4l beanspruchte 3-4 Tage. Auf die Zugabe kleiner Mengen ($0,2\text{g/l}$) NaN_3 zu den Extraktportionen zur Vermeidung bakterieller Verunreinigung wurde immer geachtet. Zum Schluß wurden die Extrakte auf $0,1\text{M}$ Tris-HCl-Puffer ($\text{pH } 7,6 + 0,01\text{M}$ EDTA + $0,04\%$ NaN_3) umgepuffert und in 20ml-Portionen bei -40°C gelagert.

Säulenchromatographie

1. Gelfiltration

Die Auftrennung der Proteine des Gewebsextraktes nach ihrem Molekulargewicht wurde über eine Sepharose 6B-Säule¹⁾ ($80 \times 5\text{cm}$) mit einem $0,1\text{M}$ Tris-HCl-Puffer, $\text{pH } 7,6 + 0,01\text{M}$ EDTA + $0,04\%$ NaN_3 durchgeführt. Das perlförmige Agarosegel mit einer Partikelgröße von $60-210\mu\text{m}$ hat eine Ausschußgrenze bei einem Molekulargewicht von 4×10^6 Dalton.

1) Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden

aufgetragen wurden 1000-1500 mg Protein in 20-30ml des obigen Puffers. Die Elution erfolgte unter kontinuierlicher Transmissionsmessung bei 280 nm¹⁾. Das Eluat wurde in 15ml-Portionen gesammelt.

Die Endreinigung der Ferritinfraktionen wurde durch hochauflösende Gel-Permeations-Chromatographie auf einer HPLC-Blue-Column (BC) (LKB 2135-460, Ultro Pac TSK-G 4000 SW, 7,5 x 600mm)²⁾ mit Vorsäule (LKB 2135-075, Ultro Pac TSK-GSWP Pre-Column 7,5 x 75mm) bei einem konstanten Druck von 6-8 bar und einer Flußrate von 0,3ml/min. vorgenommen. Als Puffer diente 0,05m Na-Phosphatpuffer pH 7,5. Bei laufender Absorptionsmessung bei 280 nm (Uvicord S)²⁾ wurde das Eluat in 0,6ml-Fractionen gesammelt (2211 SUPERRAC)²⁾

2. DEAE-Anionenaustauschchromatographie

DEAE-Zellulose ist eine Matrix, an welche Protein in Abhängigkeit von ihrem Ladungszustand adsorbieren und chromatographisch wieder eluiert werden kann. Es wurde zur Durchführung wieder ein HPLC-System benutzt (Ultro Pac 2133-110, TSK DEAE 5PW, 7,5 x 75mm; Vorsäule: Ultro Pac 2133-310, TSK SP-5PW, 7,5 x 75mm)²⁾.

Als Puffersystem dienten:

- a) Natriumphosphatpuffer 0,05m, pH 7,5 (Startpuffer)
- b) Natriumphosphatpuffer 0,05m, pH 7,5 + 0,45m NaCl (Endpuffer)

Von einem schablonengesteuerten Gradientenmischer (Ultrograd)²⁾ wurde über zwei Stunden ein linearer NaCl-Gradient von 0 bis 0,45m erzeugt (Druck 6-9 bar, Flußrate 0,5ml/min., 1,25ml

1) Uvicord II, Fa. LKB

2) Fa. LKB, Bromma, Schweden

pro Fraktion). Gemessen wurden kontinuierlich die Absorption und die Ionenleitfähigkeit der einzelnen Fraktionen¹⁾. Durch dieses Verfahren werden zuerst die alkalischen und dann die sauren Proteine eluiert.

3. Affinitätschromatographie

Immunadsorption

Bei der Affinitätschromatographie mit CNBr-aktivierter Sepharose 4B²⁾ koppelt man nach Angaben des Herstellers (239) über kovalente Bindungen zwischen primären Aminogruppen und zyklischen Imidokarbonaten hochgereinigtes Antigen (oder Antikörper) an das Sepharose 4B-Gel. Durchläuft ein Substanzgemisch eine derartige Säule, so wird nur der korrespondierende Antikörper (oder das Antigen) an das Gel immunologisch gebunden. Sind alle nichtbindenden Substanzen eluiert, kann man mit einem Puffer, der chaotrope Ionen enthält (oder einen anderen pH besitzt) die Antigen/Antikörperbindung lösen und das vorher gebundene Protein eluieren.

Herstellung einer Säule

Je nach Säulengröße wurden zwei bis maximal 15g getrocknetes Gel (Richtgröße: pro g Gel maximal 10mg Antigen oder Antikörper) in 0,001m HCl (200ml/g Gel) eingerührt und 15 Minuten quellen gelassen. Dann wurde das Gel über eine 100ml Fritte (Porengröße 3) durch Absaugen der Flüssigkeit auf 10-20ml eingeeengt, umgepuffert auf Puffer II (0,1m NaHCO₃ mit 0,5m NaCl, pH 8,3) und in ein 25ml-Plastikröhrchen gefüllt.

1) Fa. WTW, Weilheim

2) Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden

Dieser Suspension wurde die Antigenlösung (ca. 5mg alkalisches Leberferritin in 20ml PufferII) zugemischt und über Nacht bei 4°C auf einem Inkubationsrotator überkopf gedreht. Zur Entfernung des nichtgebundenen Antigens wurde das Gel dann auf eine Nutsche ausgegossen und mit Puffer II nachgespült. Nach Blockierung der restlichen reaktiven CNBr-Gruppen mit Puffer III (1M Glycinlösung, pH 8,0) über zwei Stunden bei Raumtemperatur mit mehrmaligem Pufferwechsel und je drei Waschzyklen mit Puffer IV (0,1M Acetatpuffer in 1M NaCl, pH 4,0) und Puffer V (0,1M Boratpuffer in 1M NaCl, pH 8,0) wurde das Gel zuletzt mit Startpuffer VI (0,02M Na-Phosphatpuffer mit 0,15M NaCl, pH 7,3 + 0,04% NaN_3) gespült, entgast und in eine Glassäule (z.B. 0,5 x 10cm) gegossen.

Chromatographielauf

Zum Vorlaufen und zur Entfernung unspezifischer Eiweißkörper (erster Peak) der aufgetragenen Antikörperfraktion (3-5ml) wurde Puffer VI verwandt. Dann wurde gewechselt auf Puffer VII (Puffer VI mit 3M KSCN), um die an die Säule gebundenen Ferritinantikörper (bzw. Ferritine bei angekoppelten Antikörpern) zu eluieren (zweiter Peak). Die Fraktionen der beiden Peaks wurden getrennt gepoolt, eingengt und auf Puffer VI umgepuffert. Als Test auf noch vorhandenen spezifischen Antikörper im ersten Peak diente die Immun-Doppeldiffusion nach Ouchterlony.

Ein empfindliches Durchfluß-Spektralphotometer¹⁾ verfolgte die Elution bei 280 nm, ein linearer Potentiometerschreiber zeichnete sie auf.

1) Uvicord I bzw. II, Fa. LKB, Bromma, Schweden

4. Protein-A Chromatographie

Protein A¹⁾, ein Protein aus der Zellwand von *Staphylokokkus aureus*, vermag, an Sepharose gekoppelt, IgG aus Serumfraktionen über den Fc-Anteil an sich zu binden (238).

Auf eine Protein-A-Säule (1,5 x 11,5 cm) wurden 10ml Serum mit Ferritin immunisierter Kaninchen aufgetragen, mit Puffer VI (s.o.) ein erster Peak nicht gebundener Serumbestandteile ausgewaschen und mit Desorptionspuffer (100ml Puffer VI mit 0,6ml Eisessig, pH 4-5) das an das Gel adsorbierte Immunglobulin gewonnen. Bei der Rechromatographie von Antikörper Nr 60 Prot-A/1 auf der Protein-A-Säule wurde Puffer VI auf pH 8 eingestellt und als Elutionspuffer 0,1M Glycin-HCl-Puffer pH 3,0 verwendet. Die Extinktion maß jeweils ein Spektralphotometer, ein Potentiometerschreiber registrierte sie fortlaufend.

Präparative Flachbett-Isoelektrofokussierung

Prinzip:

Wie die analytische Fokussierung trennt diese Methode Substanzgemische nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) auf. Sie dient jedoch nicht zum Nachweis oder zur Darstellung verschiedener Bestandteile, sondern zur quantitativen Gewinnung einzelner Banden am Ende der Auftrennung. Als Trennmedium wird ein 5mm dickes granuliertes Gel, welches Ampholyte im gewünschten pI-Bereich und die Probe enthält, benutzt. Am Ende der Auftrennung können einzelne Proteinfractionen aus dem Gel mit einem Spatel ausgestochen und das Protein

1) Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden

durch Spülen mit einem geeigneten Puffer leicht wiedergewonnen werden. Bei der Identifizierung des entstehenden Bandenmusters helfen Testläufe analytischer Fokussierungen und ein Papierabdruck von der Geloberfläche unmittelbar nach dem Lauf, der einer Proteinfärbung unterworfen wird.

Durchführung

Zur Herstellung des Gels wurden 5g Ultrodex Gelpulver¹⁾ zusammen mit 5ml Ampholytlösung pH 4-6,0¹⁾ in einem Plastikbecher unter schonendem Rühren mit Aqua bidest. zu 100ml Gellösung vermennt. Nachdem die Gelform (Glas, 25 x 12,5cm mit 7mm Gummiumrandung)¹⁾ an den Schmalseiten mit ampholytgetränkten (5%ige Lösung) Papierelektrodenstreifen (5mm breit) ausgelegt war, wurde das Gel zügig auf die Form gekippt und durch Antippen der Ränder des Tablettts ein gleichmäßiger Gelfilm erzeugt. Unter einem in 70 cm Abstand montierten Ventilator (ganz schwache Einstellung) trocknete das Gel bis zu einem vorher berechneten Gewicht ab (genaue Anleitung dazu siehe (285)).

Innerhalb eines kleinen rechteckigen Metallrahmens, den man auf das fertige Gel aufdrückt, wurde die Probe (3ml, 2-20mg Protein/ml) mit einer Eppendorf-Pipette aufgetragen und mit dem innerhalb des Rahmens befindlichen Gelanteil mit einem Metallspatel schonend vermennt. Der Probenapplikator wurde dann entfernt, und es wurde darauf geachtet, daß das Gel-Rechteck, das jetzt die Probe enthielt, sich rundum wieder eng und ohne Lufteinschluß an das übrige Gel anlegte. Der geeignetste Ort für den Probenauftrag liegt etwa 4-5cm vor oder hinter dem durch analytische Fokussierungen ermittelten Fokussierungsbereich des Proteins.

1) Fa. LKB, Bromma, Schweden

Die Maximaleinstellung lag während des Laufes bei 2000V und 8 Watt. Mit dem Stromstärkeregler wurde die Anfangsspannung auf etwa 100V eingestellt. Während des Laufes auf dem LKB-Multiphor 2117¹⁾ bei 10°C stieg die Spannung dann allmählich auf etwa 1500 V an, während die Stromstärke von ca. 13mA anfangs auf ca. 5mA gegen Ende des Laufes abfiel. Nach 14-18 Stunden waren die Banden fokussiert. Zur Dokumentation wurde ein Filterpapierabdruck (ca. 5cm breiter Streifen, vorsichtig auf das Gel auflegen, nach 5-10 Sekunden abziehen und fixieren und färben wie ein analytisches Gel) von der Geloberfläche angefertigt. Der pH-Gradient wurde mit einer Oberflächen- Glaselektrode¹⁾ kontrolliert. Die Proteinbanden wurden mit einem Spatel aus dem Gel ausgestanzt, in kleinen Plastiksäulen über Nylonfilter mit Aqua bidest. aus der Gelsubstanz ausgespült, fraktionsweise gepoolt und über ein Unterdrucksystem in Kollodiumhülsen²⁾ eingeengt.

Zentrifugation

Die Zentrifugation der Gewebsextrakte erfolgte über 120 min. bei 9000 Upm in einer Kühlzentrifuge³⁾ bei 4°C, die der eingengten Extrakte in einer Tischzentrifuge⁴⁾ bei 15000Upm (10000g) über 60 min. im Kühlraum. Die Serumproben für die Ferritinbestimmung im RIA wurden durch zehnminütige Zentrifugation von Nativblut in einer Laborzentrifuge⁵⁾ bei 3000Upm

1) Fa. LKB, Bromma, Schweden

2) Fa. Sartorius, Göttingen

3) Fa. Kontron, Eching bei München

4) Fa. Christ, Osterode

5) Fa. Hettich, Zentrifuge Rotanta/K, Typ UI 35

(1000g), das Präzipitat in den RIA-Teströhrchen am 2. bzw. 3. Testtag in einer Laborzentrifuge¹⁾ bei 4000 Upm (2000g) über 30 Minuten gewonnen.

Konzentrierung

Die Einengung kleiner Mengen Proteinlösungen erfolgte in Kollodiumhülsen (SM 13200) aus Zellulosenitrat (15 x 75mm)²⁾ in speziellen Haltevorrichtungen mittels eines Vakuums von bis zu -500 mm/Hg (Dauer 1-10 Stunden). Mengen über 100ml, z.B. Sammelfractionen oder Gewebsextrakte, wurden in einem Amicon-Ultrafiltrationssystem unter Verwendung von Einengungszylindern verschiedener Größe mit eingebautem Rührmagneten³⁾ und semipermeablen Membranen (XM 300: Proteinausschlußgrenze 300 000 Daltons; PM 10: Ausschlußgrenze 12 500 Daltons) eingengt, wobei Stickstoff-Pressluft einen Filtrationsdruck von 5kg/cm² erzeugte. Bei Bedarf konnte in das Drucksystem ein Vorratsgefäß bis zu 4l eingeschaltet werden, ein automatisches Endpunkt-Überwachungsgerät schützte vor Überkonzentrierung.

Lagerung

Da gereinigtes Ferritin durch Lyophilisation (202) oder Einfrieren und Auftauen Schaden nehmen kann, wurden die Lösungen mit 0,04% NaN₃ Zusatz bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

1) Fa. Hettich, Zentrifuge Roto Silenta/K

2) Fa. Sartorius, Göttingen

3) Fa. Amicon, Oosterhoudt, Holland

2.2.1.3 Herstellung von Antiseren

Immunisierung

Zur Immunisierung wurden Kaninchen (Neuseeländer, ca. 6kg) verwandt. Als Antigen diente dabei gereinigtes Gesamtferritin sowie die sauerste Ferritinfraktion aus menschlichem Herzgewebe.

Nach einem Schema von Hijmans et al. (131) in leicht modifizierter Form wurden ca. 500µg Antigen in 2ml physiologischer Kochsalzlösung mit 2ml komplettem Freund'schem Adjuvans versetzt und subkutan in die Fußsohlen (0,2-0,3ml/Fußsohle), der Rest i.m. injiziert. Nach einer Woche wurde der Vorgang mit inkomplettem Freund'schem Adjuvans wiederholt.

Drei Wochen später folgte über weitere drei Wochen die Boostierung mittels einer Serie von i.v. Immunisierungen steigender Antigenmengen. Diesmal wurde eine Suspension aus 500-1000µg Antigen in 2,5ml 0,9%iger NaCl-Lösung mit 1,15ml 1N Bicarbonatlösung und 2,5ml 10%iger KAl-Sulfatlösung (tropfenweise!) hergestellt, über Nacht bei 4°C inkubiert, bei 1000g (=3000 Upm) für 30 Minuten zentrifugiert, das Präzipitat in 4ml physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert und 0,5ml-portionweise eingefroren.

Zweimal wöchentlich erfolgte eine Injektion in die Ohrvene des Kaninchens nach folgendem Schema:

1. Woche: 0,05ml/ 0,1ml i.v.
2. Woche: 0,1 ml/ 0,2ml i.v.
3. Woche: 0,2 ml/ 0,4ml i.v.

Ergab die Untersuchung einer Serumprobe des Kaninchens (Inkubation für 1 Stunde bei 37°C, über Nacht bei 4°C, Zentri-

fugation für 15 min. bei 1000g/3000 Upm) eine Woche nach der letzten i.v. Immunisierung in der Immundiffusionsmethode nach Ouchterlony bzw. im Radioimmunoassay eine ausreichende Konzentration des spezifischen Antikörpers, dann wurde das Kaninchen nach Ablauf einer weiteren Woche entblutet.

Absorption und Reinigung

Zuerst wurde das gewonnene Antiserum mit lyophilisierten Normalserumproteinen versetzt (10mg/ml Serum), um mögliche Antikörper gegen Serumproteine zu absorbieren. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C und über Nacht bei 4°C wurden die ausgefällten Antigen/Antikörperkomplexe für 60 min. bei 10 000g (15000Upm) abzentrifugiert.

Die IgG-Fraktion, welche die überwiegende Menge des spezifischen Antikörpers enthielt, wurde mit Hilfe einer Protein A Säule (siehe 2.2.1.2) gewonnen. Die gepoolten und konzentrierten Fraktionen des 2. Peaks wurden auf Antikörperreaktivität getestet und in kleinen Portionen bei -40°C aufbewahrt.

Immunad-/desorption

Um eine noch höhere Spezifität des Antikörpers gegen saures Ferritin zu erzielen, wurden die IgG-Antikörper z.T. mehrfach an eine CNBr-aktivierte Sepharose 4B-Säule adsorbiert und eluiert, an die zuvor die alalkischste Leberferritinfraktion angekoppelt worden war. Als "spezifisch anti-sauer" wurden dann die gepoolten Fraktionen der 1. Peaks, also der nicht

an das alkalische Ferritin bindende Antikörperanteil der Gesamtfraktion, betrachtet.

Des weiteren wurden Ad- und Desorptionsversuche der Antikörper mit Sepharose 4B-Säulen unternommen, an die saure oder alkalische Plazentaferritine gekoppelt worden waren.

Die erzielte Spezifität des Antikörpers nach den einzelnen Adsorptionsschritten wurde im Ouchterlony-Test oder schließlich in Antikörperverdünnungsreihen mit saurem oder alkalischem Tracer untersucht.

2.2.1.4 Berechnungen

Für sämtliche Berechnungen wurden die programmierbaren Taschenrechner Hewlett-Packard Hp 65 und 41 CV¹⁾ mit laboreigenen statistischen Programmen nach einschlägiger Literatur benutzt.

Markierung

Unter Zugrundelegung der Zählraten wurde der durch Verluste an Pipettierspitze und Reaktionsgefäß bedingte prozentuale Aktivitätsverlust bezogen auf die Gesamtaktivität und die Verteilung der Radioaktivität auf Protein- und Salzpeaks der ersten Säule errechnet. Unter Voraussetzung einer gleichmäßigen Markierung des Proteins mit ¹²⁵Jod ließen sich über die Gesamtaktivität der Säulenfraktionen und die spezifische Aktivität die Radioaktivität und Proteinmenge der für den RIA verwandten Fraktionen der zweiten Säule errechnen.

1) Fa. Hewlett-Packard, Frankfurt a. M.

Antikörperverdünnungsreihe und RIA

Von allen im Gammazähler ermittelten Zählraten (außer T-Werte) wurde zuerst der Wert der unspezifischen Bindung subtrahiert. Anschließend wurden die Counts (=Zählrate) aller Antikörperverdünnungen (=proportional zur Bindung an den Tracer) als Prozentwert der Gesamtaktivität (T-Werte) angegeben und in ein Diagramm (Ordinate: %-Aktivität; Abszisse: Verdünnungsstufe) eingetragen. Als Bezugspunkt für die Beurteilung verschiedener Antikörper diente die Verdünnungsstufe, welche einer 50%igen Bindung des Tracers entsprach (=50%-Punkt).

Beim RIA wurde nach Abzug der N-Werte zuerst die maximale Bindung zwischen Antikörper und Tracer (= Counts des Nullwertes als prozentualer Anteil der T-Werte) ermittelt und gleich 100% gesetzt. Die Zählraten der Standardreihen wurden dann als Prozentwert dieser maximalen Bindung angegeben und als logit auf ein spezielles logit-log Papier (Ordinate: logit l; Abszisse: log Ferritinkonzentration) ($\text{logit } l = \ln \frac{p}{100-p}$, p= Bindungsaktivität in %) aufgetragen, wobei sich eine lineare Beziehung zwischen der gebundenen Aktivität (in logit) und dem Logarithmus der entsprechenden Ferritinkonzentration ergibt. Ein spezielles Rechnerprogramm (167) ermittelte nach Eingabe der logit/log-Werte der Standards den linearen Korrelationskoeffizienten r, die Standardabweichung $s_{y \cdot x}$ und die lineare Regressionsgeradengleichung mit den Geradenparametern A und B nach dem Prinzip der kleinsten Abweichungssumme. Die Affinitätskonstante K_a wurde nach dem SCATCHARD-PLOT-Verfahren (251) ermittelt. Ein Computerprogramm des Gammazählers berechnete automatisch nach Auszählung der Impulsraten der Probenröhrchen unmittelbar die gesuchten Ferritinkonzentrationen nach der Spline-Funktion und druckte sie mit aus.

Statistische Berechnungen

Für das Normal- bzw. die Patientenkollektive wurden nach eigenen Programmen auf dem Tischcomputer HP 41C folgende statistische Untersuchungen vorgenommen: Für die Meßwerte verschiedener Kollektive wurden nach Sachs (260) arithmetisches Mittel, Median, 10. und 90. Perzentil und Sensitivität der einzelnen Marker (saures Ferritin, Gesamtferritin, CEA) berechnet. Bei normalverteilten Kollektiven wurde der T-Test und bei nicht normalverteilten der Kolmogoroff-Smirnoff-Test durchgeführt.

2.2.2 MATERIALIEN UND PATIENTENGUT

2.2.2.1 Materialien

Extrahierte Gewebe

Für die zwei Präparationen menschlichen Lebergewebes wurde unmittelbar nach der Entnahme auf -40°C tiefgefrorenes Sektionsmaterial benutzt. Die Ausgangsmengen betrugen nach Entfernen von Fett und grobem Bindegewebe 2,5 bzw. 1,6 kg Feuchtgewicht.

Des weiteren wurden zwei Präparationen von 6 bzw. 13 gepoolten und auf die gleiche Weise konservierten menschlichen Herzen durchgeführt (Nettofeuchtgewicht 1,05 bzw. 1,8kg). Die Präparate stammten alle aus der Prosektion des Pathologischen Instituts am Klinikum Großhadern in München.

Standardproteine

Die bei der Eiweißbestimmung nach Lowry benutzten Standards waren: Lyophilisiertes Pferdemicz-Ferritin (5 x kristallisiert und lyophilisiert)¹⁾, hochgereinigtes und lyophilisiertes Kaninchen- γ -Globulin²⁾ und Kaninchen-Albumin (trocken, reinst)³⁾. Die Konzentrationen zwischen 50 und 1000 $\mu\text{g/ml}$ wurden mit einer Feinwaage (Typ 2405)⁴⁾ abgewogen.

Beim RIA fanden ein kommerzieller Ferritinstandard von der Leber⁵⁾ in den Konzentrationen 5-500 ng/ml, eine alkalische Ferritinfraktion aus der eigenen Leberpräparation (5-20 000 ng/ml) in geometrischer Verdünnung und ein saurer Herzferritin-Standard aus eigener Produktion (1,25 bis 1280 ng/ml) Verwendung.

Die Kontrollseren für den Gesamtferritin-RIA aus einer früheren Ferritinpräparation des Labors hatten einen Vertrauensbereich zwischen 117-148 ng/ml bzw. 62-69 ng/ml. Die Kontrollseren für den sauren RIA bestanden aus einer Mischung eigener saurer Ferritine mit Normalseren oder ferritinfreiem Behringserum.

Für die IEF wurden pI-Marker in den Bereichen pH 3-10 und pH 5-10,5⁶⁾, für die Elektrophorese Molekulargewichtsmarker in zwei Gewichtsbereichen benutzt⁷⁾. Als Ampholyte für die IEF in Agarose dienten Ampholine Charge 1818-116 (pH 4-6,5), in Polyacrylamid Charge 1809-116 (pH 4-6) und 1809-111 (pH 3,5-5,0)⁸⁾.

1) Fa. Serva, Feinbiochemica, Heidelberg

2) Fa. Nordic Immunology, Tilburg-Berchem (Antwerpen)-London

3) Fa. Behringwerke, Marburg, Lahn

4) Fa. Sartorius, Göttingen

5) Fa. Becton&Dickinson, Orangeburg, New York

6) Fa. LKB, Bromma, Schweden

7) Fa. Pharmacia, Fine Chemicals, Uppsala, Schweden

Tracer

Markiert als saurer und alkalischer Tracer wurden die gleichen Ferritinfraktionen (die sauerste Herz- und die alkalischste Leber-Ferritinfraktion) wie für die Standardreihen. Als Tracer für den Gesamtferritin-RIA diente eine mehr alkalische Lungenkarzinomferritinfraktion aus einer Vorpräparation (LCES BC DEAE III) des Labors.

Antiseren

Für die Ouchterlony-Doppeldiffusionsuntersuchungen wurden kommerzielle mono- und polyvalente Antiseren gegen Serumproteine¹⁾ bezogen. Die für die Affinitätschromatographie benötigten Anti-Ferritinseren waren, bis auf die Präparation C33 und C48 (Anti-Leberferritin bzw. Anti-Plazentaferitin) aus Laborbeständen, eigene Präparationen, ebenso die Antikörper für den sauren RIA. Der Antikörper für den Gesamtferritin-RIA Nr.52 PA/3 d/3 a/3 (Immunisierung mit sauren Ferritinen aus Lungenkarzinomgewebe) entstammte einer früheren Präparation des Labors. Für Ouchterlony- und RIA-Studien wurden ferner ein Anti-Herzferritinantikörper A-HHF HT 10 von M. Worwood (Dep. of Haematology, Univ. of Wales, College of Medicine, Cardiff, U.K.), der monoklonale Antikörper gegen H-Ketten 2A4 (P. Arosio, Instituto Science Biomediche, Ospedale San Raffaele, Milano, Italy) und der Antikörper Nr.49 gegen alkalisches Plazentaferitin verwandt. Der Antikörper Nr. 59 entstand durch Immunisierung mit Gesamtherzferritin, der Antikörper Nr. 60 durch Immunisierung mit der sauersten Fraktion von Herzferritin (HHF I).

1) Fa. Behringwerke, Marburg

2.2.2.2 Patientengut

Normalkollektiv

Als Normalkollektiv dienten 104 gesunde Männer im Alter von 20 bis 45 Jahren.

Patienten mit malignen Erkrankungen

Es wurden Serumproben von 290 Patienten mit malignen Erkrankungen untersucht. Darunter befanden sich 28 Patienten mit akuter und 13 Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie, 22 Pankreas-, 32 Magen-, 30 Kolon-, 48 Bronchial- und 19 Nierenkarzinom-Patienten, sowie 19 Patienten mit Ovarial-, 50 mit Mamma- und 29 mit primärem Leberzell-Karzinom.

Die einzelnen Kollektive stellten jeweils einen Pool verschiedener Krankheitsstadien und unterschiedlicher Tumorphistologien dar. Bestimmt wurden in allen Seren das saure Ferritin mit dem eigenen, neuen RIA und das Gesamtferritin mit einem laboreigenen Assay. Verglichen wurden diese Ergebnisse bei den meisten Kollektiven noch mit dem Serumspiegel des carcinoembryonalen Antigens (CEA).

Patienten mit nicht-malignen Erkrankungen

Untersucht wurden die Seren von 33 Patienten mit Leberzirrhose, 20 mit Hepatitis und 19 Patienten mit Eisenmangelanämie.

2.2.3 EIGENE ERGEBNISSE

2.2.3.1 Methodischer Teil

Gewebeextraktion

Es wurden insgesamt zwei Leber- und zwei Herzpräparationen durchgeführt.

Die Ferritinausbeute aus dem Gewebsextrakt war bei der zweiten Präparation jeweils deutlich höher (Leber: 1180mg Ferritin gegenüber 500mg; Herz: 22,5mg gegenüber 2,5 mg aus der ersten Präparation), der Ertrag an Ferritin aus dem Herzgewebe lag dabei um den Faktor 50 bis 200 unter dem aus dem Lebergewebe.

Die Präparation erwies sich vor allem bei dem sehr festen und faserreichen Herzgewebe als sehr mühsam, die Messer des Homogenisators umwickelten sich wiederholt mit fasrigen Gewebsanteilen, und der Kolben des Potters setzte sich des Öfteren in seinem Glaskolben fest. Nach der ersten Zentrifugation mußte zuerst eine Fettschicht von der Oberfläche der Überstände entfernt werden. Die Einengung im Amicon-System erstreckte sich über mehrere Tage, wobei mehrmals die Kunststofffilter verstopften und teilweise durch neue ersetzt werden mußten. Manchmal konnte die Einengung nur mit den Filtern mit der höheren Ausschlußgrenze (MG 300 000) fortgesetzt werden. Die anschließende Ultrafiltration konnte oft nicht bis zum Bakterienfilter (0,22µm) vollzogen werden. Der gewonnene Extrakt war schließlich klar, aber ziemlich viskös. Die durch die Einengung im Amicon-System abgepreßten Filtrate erwiesen sich im Ouchterlony als Ferritin-negativ (nicht gezeigt).

Reinigung des Antigens

In Portionen von 15 ml wurde der Extrakt über eine Sepharose 6B-Säule von verunreinigenden Proteinen anderen Molekulargewichts als Ferritin getrennt. Das Eluat wurde in 4 oder 5 Fraktionen (S-6B I-IV oder S-6B I-V) unterteilt, welche im RIA (Gesamtferritin-RIA des Labors aus Vorarbeiten) auf ihren Ferritingehalt geprüft wurden. Abbildung 4 und 5 geben typische Elutionsdiagramme von Herz- bzw. Leberferritin-Extrakt und die Ferritinkonzentrationskurven aus der Messung in den Einzelfraktionen wieder. Die Ausbeute an Ferritin nach der S-6B-Säule lag bei den vier Präparationen zwischen 55 und 80% (= zweite Herzpräparation).

Beim Leberextrakt wurden die III, IV und die letzten Anteile der Fraktion II, beim Herzextrakt Fraktion II und III gepoolt und weiterverarbeitet.

In den Ouchtelony-Testungen Abb. 6 bis Abb. 9 läßt sich die Verteilung des Ferritins auf die einzelnen Fraktionen und die starke Verunreinigung aller Fraktionen mit Serumproteinen in diesem Stadium der Reinigung, vor allem durch Albumin und Immunglobulin, erkennen. Fraktion I und V (Herz I und IV) waren jeweils ferritinfrei.

Als nächster Reinigungsschritt folgte die Immunaффinitätschromatographie der gepoolten S-6B-Fraktionen an CNBr-aktivierte Sepharose-4B. An die C33-Säule war ein Leberferritin-Antikörper (Nr. 33), an die C48-Säule ein Plazenta-ferritin-Antikörper (Nr. 48) angekoppelt worden. Abb. 10 und 11 zeigen jeweils ein Beispiel eines Elutionsdiagrammes von Herz- oder Leberferritin: Die Fraktionen C33/1 und C48/1 entsprechen dabei den nicht an die Säule gebundenen Substanzen. Sie wurden bei positivem Ferritinnachweis im Ouchterlony (Abb. 12) teilweise mehrmals rechromatographiert bis zum negativen Ausfall der Testung, oder bis sie so viskös und dunkel gefärbt waren,

daß ein neuerlicher Auftrag die Säule irreversibel geschädigt hätte.

Die Fraktionen C33/3 und C48/3, welche die an den Antikörper der Säule adsorbierten Anteile des Extraktes umfassen, wurden weiterverarbeitet. Abb. 12 und 13 zeigen die nach der Immunadsorption an die C48-Säule erzielte Reinheit der Ferritinfraktionen. Da sie sich noch mit anderen Serumproteinen, v.a. Albumin, verunreinigt zeigten, wurden sie über eine Sepharose-4B-Säule, an die Anti-Humanserum (AHS) gekoppelt war, weiter gereinigt. In Abb. 14 reagierte eine Leberferritinfraktion C33/3 nach diesem Schritt nur noch mit Anti-Ferritinserum.

Bei den vier Präparationen waren nach der Immunaффinitäts-Chromatographie zwischen 18,8% (1. Leberpräparation), 35% (2. Leberpräparation, 2. Herzpräparation) und 44% (1. Herzpräparation) der Ausgangsmenge an Ferritin noch vorhanden.

Abb. 4: Gelfiltration des Leberextraktes über Sepharose-6B, Auftrennung nach dem Molekulargewicht. Willkürliche Einteilung in Fraktionen I-IV (Kurve A). Kurve B zeigt das Ergebnis der Ferritinmessung in den einzelnen Fraktionen.

Abb. 5: Gelfiltration des Herzextraktes über Sepharose-6B. Die Einteilung erfolgte in die Fraktionen I-IV. Kurve B gibt wieder Auskunft über die Ferritinkonzentration der einzelnen Fraktionen.

Abb. 6: Immundiffusionsuntersuchung der Leberextrakt-Fraktionen nach der Sepharose-6B-Chromatographie im Ansatz gegen das Anti-Ferritinserum Nr. 48 (gegen Plazenta-ferritin): Reaktion am stärksten mit Fraktion III, schwächer auch mit Fraktion II und IV, ebenso mit dem Gesamtextrakt.

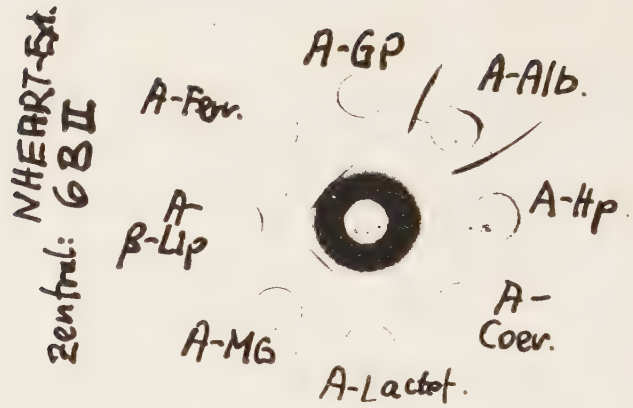


Abb. 7:

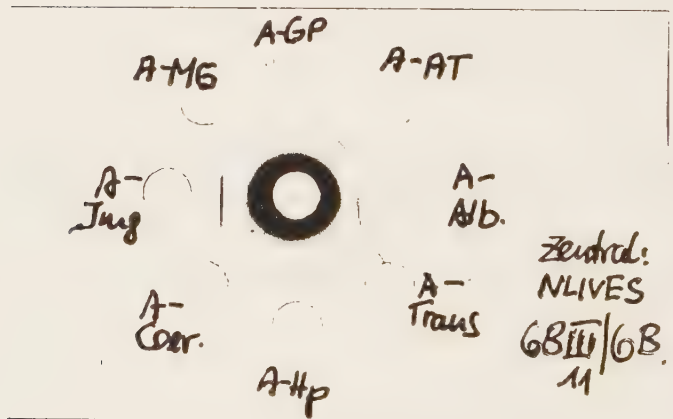


Abb. 8:

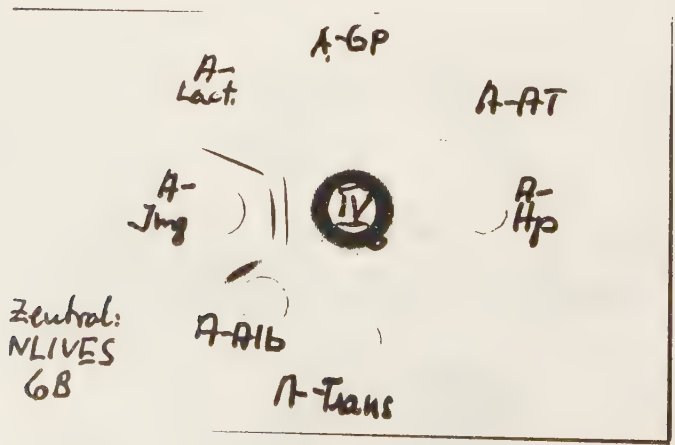


Abb. 9:

Abb. 7: Immundiffusionsuntersuchung der Herzferritin-Fraktion II nach Sepharose-6B-Chromatographie im Ansatz gegen Antiseren gegen α_1 -Glykoprotein (A-GP), Albumin (A-Alb), Haptoglobin (A-Hp), Coeruloplasmin (A-Coer), Laktoferrin (A-Lactof), Makroglobulin (A-MG), β -Lipoprotein (A- β -Lip) und Ferritin (A-Ferr) (Fa. Behringwerke). Präzipitationslinien zeigen sich gegen Anti-Albumin, -Makroglobulin, -Ferritin und -Glykoprotein.

Abb. 8: Immundiffusionsuntersuchung mit Leberferritin-Fraktion III nach Sepharose-6B-Chromatographie wie oben, zusätzlich angesetzt gegen Anti-Antitrypsin (A-At), Anti-Immunglobulin (A-Img) und Anti-Transferrin (A-Trans). Positiver Nachweis von Antitrypsin, Makroglobulin, Albumin, Immunglobulin und Haptoglobin.

Abb. 9: Immundiffusionsuntersuchung mit Leberferritin-Fraktion IV, wie vorherige Abbildung. Anstelle von Anti-Makroglobulin ist Anti-Laktoferrin (A-Lact) aufgetragen. Positiver Nachweis von Antitrypsin, Transferrin, Immunglobulin (Doppellinie) und Albumin.

IMMUNADSORPTION VON HUMANEM LEBERFERRITIN

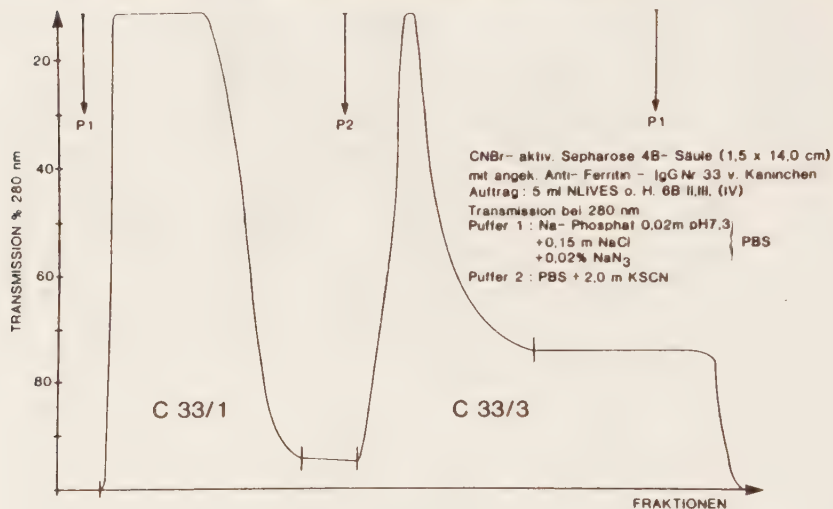


Abb. 10:

IMMUNADSORPTION VON HUMANEM HERZFERRITIN

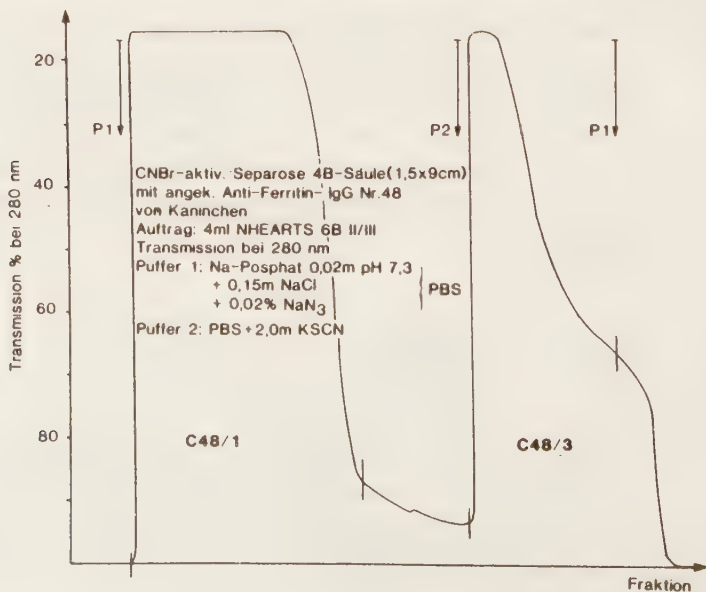


Abb. 10: Immunaффinitätschromatographie des Leberextraktes nach Sepharose-6B-Gelfiltration. An die Sepharose-4B-Säule war ein Antikörper gegen Leberferritin gekoppelt. Der 2. Peak stellt das Ferritin dar, das an die Säule gebunden hatte und durch Pufferwechsel eluiert wurde (=C33/3). Der erste Peak mit den nicht gebundenen Substanzen wurde mindestens einmal rechromatographiert.

Abb. 11: Immunaффinitätschromatographie des Herzextraktes nach Sepharose-6B-Gelfiltration. An die Sepharose-4B-Säule war jetzt ein Antikörper gegen Plazentaferritin gekoppelt. Fraktion C48/3 ist die ferritinreiche, durch den Pufferwechsel von der Säule eluierte Fraktion, die weiter verarbeitet wurde.

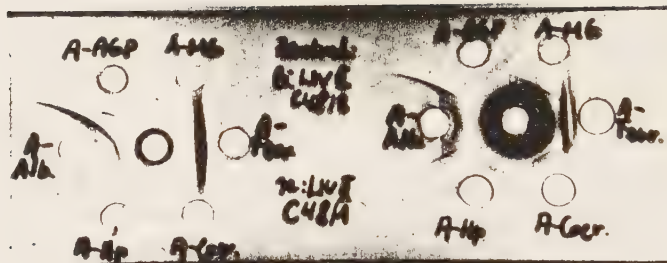


Abb. 12:

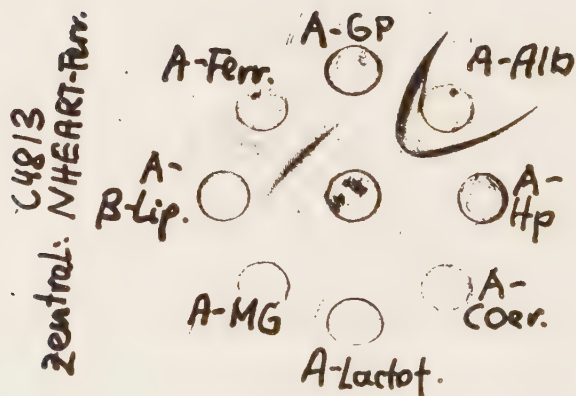


Abb. 13:

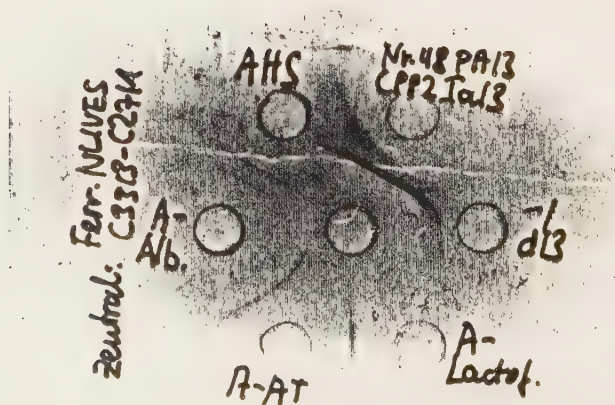


Abb. 14:

Abb. 12: Immundiffusionsuntersuchung der Leberferritin-Fractionen C48/1 (rechts) und C48/3 (links) gegen Antiseren gegen Makroglobulin (A-MG), Ferritin (A-Ferr), Coeruloplasmin (A-Coer), Haptoglobin (A-Hp), Albumin (A-Alb) und α_1 -Glykoprotein (A-AGP). Fraktion C48/1 reagierte mit allen Antikörpern, einschließlich Anti-Ferritin. Fraktion C48/3 ist nur noch durch Albumin verunreinigt.

Abb. 13: Immundiffusionsuntersuchung der Herzferritin-Fraktion C48/3 gegen Antikörper wie Abb. 12, zusätzlich Anti-Laktoferrin (A-Lactof) und Anti- β -Lipoprotein (A- β -Lip). Reaktion des Ferritins nur mit Anti-Albumin- und Anti-Ferritin-Serum.

Abb. 14: Immundiffusionsuntersuchung der Leberferritin-Fraktion C33/3 nach Reinigung über eine AHS-gekoppelte Sepharose-4B-Säule. Auftrag gegen einen Antikörper gegen alkalisches Plazentaferritin (Nr. 48 PA/3 cpp₂ Ia/3) und saures Plazentaferritin (-/d3), gegen Laktoferrin (A-Lactof), Antitrypsin (A-AT), Albumin (A-Alb) und Anti-Humanserum (AHS). Die Fraktion reagierte sehr stark mit dem alkalischen und nur sehr schwach mit dem sauren Antikörper. Sonst waren keine Reaktionen sichtbar.

Mit den Ferritinextrakten aus der ersten Leber- und Herzferritinpräparation wurde eine Anionenaustauschchromatographie auf der HPLC BC-DEAE-Säule durchgeführt, um die Isoferritine zu gewinnen. Es wurde ein langstreckiger Peak eluiert, der willkürlich in drei bzw. vier Fraktionen unterteilt wurde (a= alkalischste Fraktion; d= sauerste Fraktion) (Abb. 16 unten und 17). Zur schärferen Abgrenzung, v.a. der Randfraktionen a und d, wurden diese über den gleichen NaCl-Gradienten rechromatographiert. Das Rechromatographie-Diagramm eines Gemisches von a und d zeigt zwei scharf getrennte Peaks ohne die mittleren Fraktionen (Abb. 16, oben). Bei den Herzfraktionen a und c wurde wegen der geringen Materialmenge auf diese letzte Darstellung verzichtet.

Um noch vorhandene Spuren verunreinigender Proteine zu entfernen, und um möglichst homogene Ferritinfraktionen aus Monomeren zu erhalten, wurden die Einzelfraktionen noch einer hochauflösenden Gelpermeations-Chromatographie (Ultro Pac TSK G-4000) unterworfen (Abb. 18): Der hohe Peak der Fraktion III repräsentiert dabei die Monomere, Fraktion II und I die Di- bzw. Trimere. Fraktion I und II wurden verworfen, Fraktion III wurde über das gleiche System rechromatographiert.

Nach Abschluß der z.T. mehrfachen Chromatographieläufe über das HPLC-DEAE bzw. HPLC-G-4000-System waren von den 1,1mg Herzferritin (nach Affinitätschromatographie) noch 650µg (= 59%), von den 94 mg Leberferritin (nach Immunadsorption an die C33-Säule) noch ca. 30 mg (<30%) übrig. Davon machten saures Herzferritin (Fraktion c nach DEAE) 50µg, alkalisches Leberferritin (Fraktion a nach DEAE) 9,0 mg aus. Aufgrund der relativ geringen Ausbeute nach diesen beiden letzten Chromatographieschritten und der starken Überlappung der Isoferritine in der analytischen Isoelektrofokussierung (nicht dargestellt), wurde die Anionenaustauschchromatographie bei den

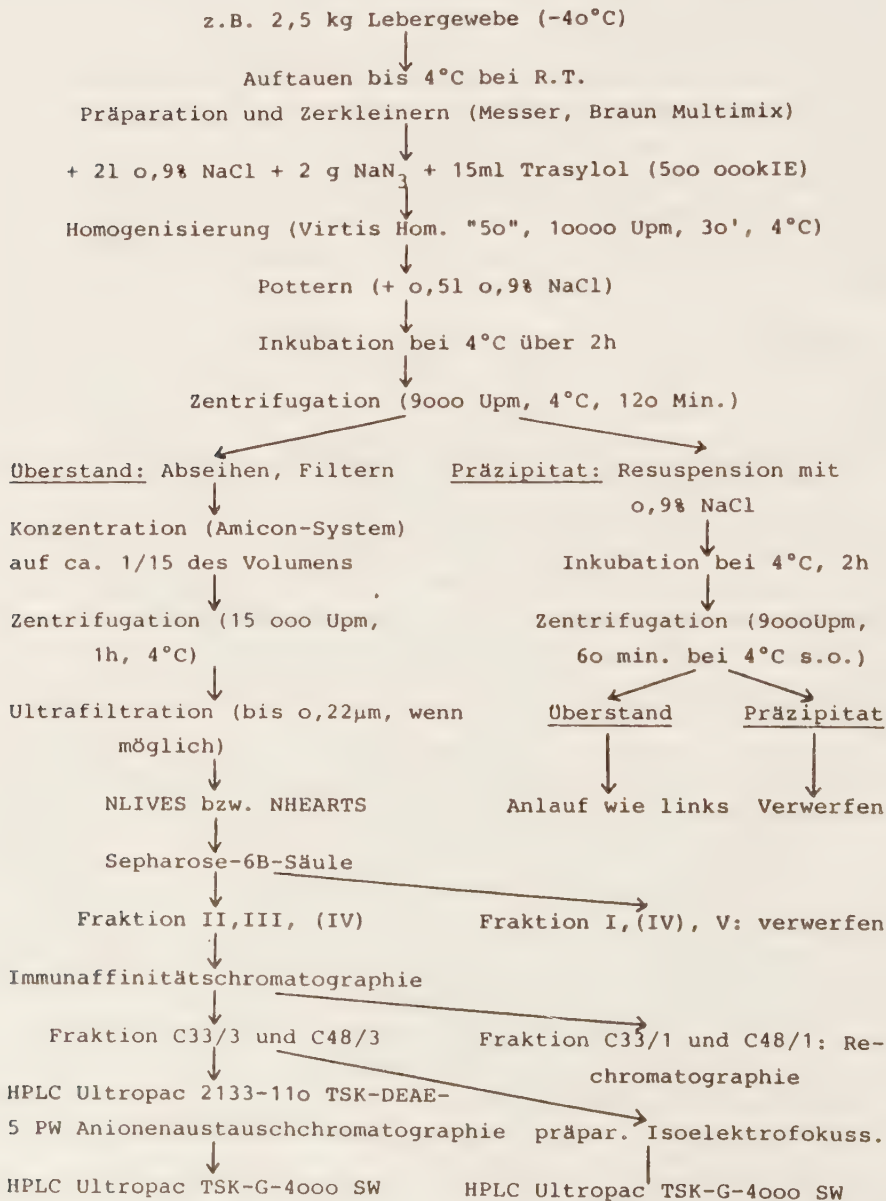
folgenden Ferritinpräparationen durch die präparative Isoelektrofokussierung ersetzt.

Nachdem durch eine bakterielle Verunreinigung der alkalischen Leberferritin-Fraktion nochmals $\frac{2}{3}$ des Materials verlorengegangen waren, wurde der Rest von 2,4 mg an eine CnBr-aktivierte Sepharose-4B-Säule gekoppelt (= C-fer alk. I). Die Herzferritin-Fraktionen wurden vereinigt und für die Immunisierung eines Hasen verwandt, daraus entstand dann Antikörper Nr. 59.

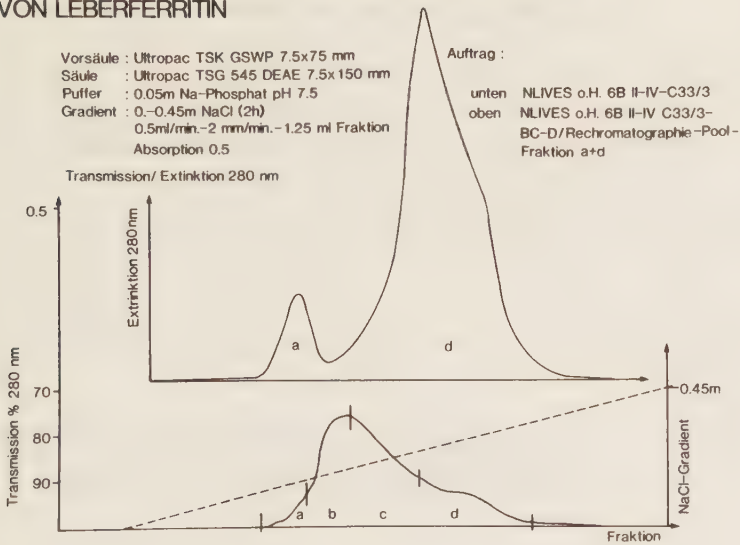
In Abbildung 19 und 20 sind Beispiele analytischer Fokussierungen von Gesamtherz- und Gesamtleberferritin nach der Affinitätschromatographie dargestellt. Dabei wird deutlich, daß Herzferritin ebenso wie Leberferritin Isoferritine im alkalischen Bereich bis pI 5,4 (Agarosegel, Abb. 20) bzw. bis 5,6 (Polyacrylamidgel, Abb. 19) besitzt. Im sauren Bereich reicht das Herzferritin bis pI 4,7, die sauersten Leberferritine liegen bei pI 5,25. Die pI-Bereiche stellen sich in beiden Gelen sehr ähnlich dar, das Bandenmuster läßt keine Gemeinsamkeiten erkennen. Beide Ferritinfraktionen waren vor der Fokussierung auf ihre negative Reaktion mit Anti-Albumin- und Anti-Humanserum getestet worden (Abb. 21).

In Abbildung 15 sind die Gewebsextraktion und die Säulenchromatographie in einem Flußdiagramm zusammengestellt.

Abb. 15: Flußdiagramm der Gewebsextraktion und der Säulen-
chromatographie



HPLC-ANIONEN-AUSTAUSCHER-CHROMATOGRAPHIE VON LEBERFERRITIN



- Abb. 16:

HPLC-ANIONEN-AUSTAUSCHER-CHROMATOGRAPHIE VON HERZFERRITIN

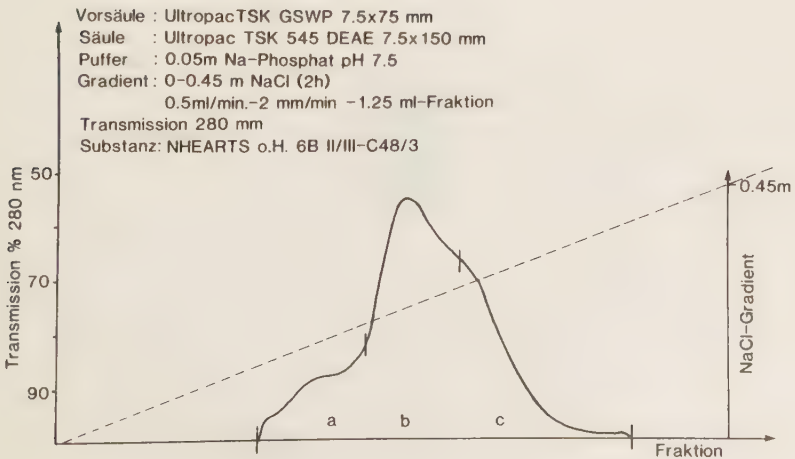


Abb. 17:

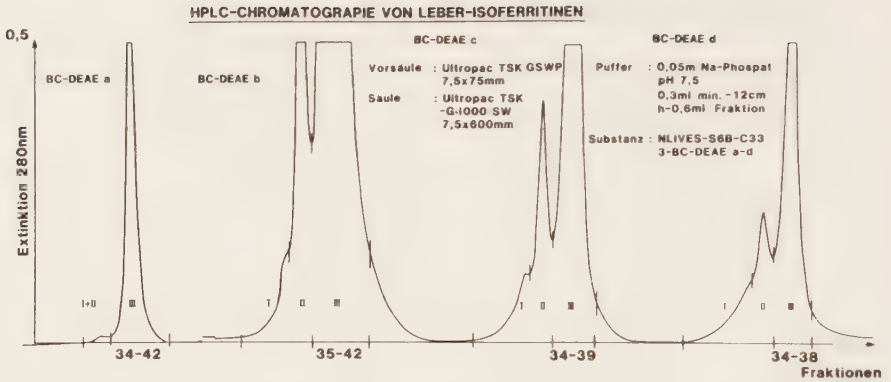


Abb. 18:

ANALYTISCHE ISOELEKTROFOKUSSIERUNG VON HUMANEN GEWEBSFERRITINEN

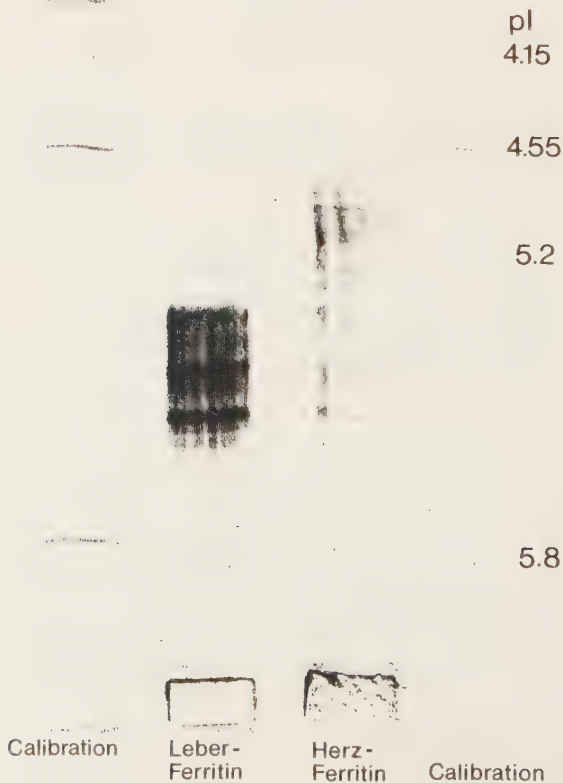


Abb. 18: HPLC-Chromatographie der Leberisoferritine nach der Anionenaustauschchromatographie. Fraktion a stellt die alkalischste, Fraktion d die sauerste Fraktion dar (= BC DEAE-d). Fraktion III enthält die Monomere, Fraktion II und I die Di-, bzw. Trimere.

Abb. 19: Analytische Isoelektrofokussierung von Gesamt-leber- und Gesamtherz-Ferritin C48/3 bzw. C33/3 (= NLIVES bzw. NHEARTS). Die sauren Isoferritine reichen bis pI 4,7, die alkalischen bis etwa 5,25. Im alkalischen Bereich haben beide Isoferritine bis pI 5,6.

ANALYTISCHE ISOELEKTROFOKUSSIERUNG IN AGAROSE (0.8%) VON HUMANEN GEWEBSFERRITINEN

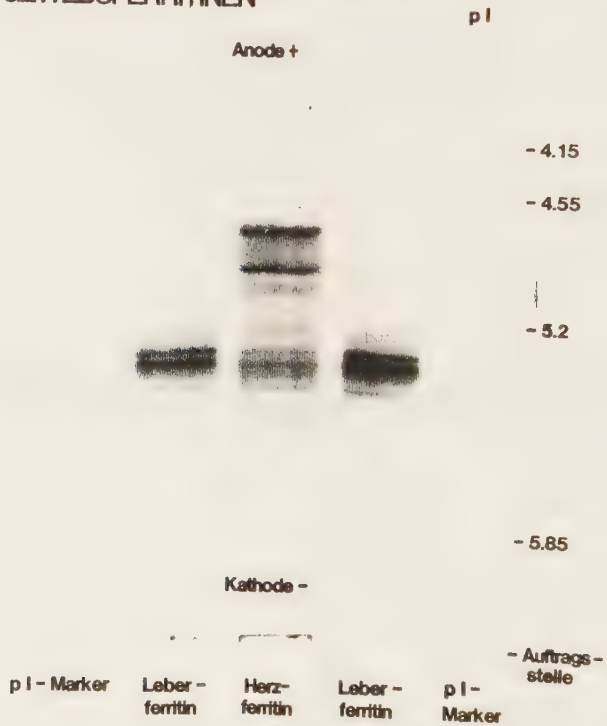


Abb. 20:

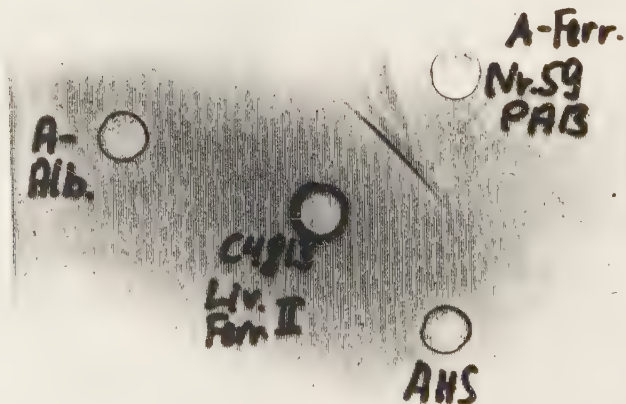


Abb. 21:

Abb. 20: Analytische Isoelektrofokussierung von Gesamtherz- und Gesamtleber-Ferritin C33/3 und C48/3 in einem 0,8%igen Agarosegel. Seitlich sieht man die pI-Marker zum Vergleich. Deutlich stellen sich die sauren Isoferritine des Herzferritins bis pI 4,7 dar. Die alkalischen Leberferritine erstrecken sich in dieser Darstellung nur zwischen pI 5,2 bis 5,4. Die Verteilung der Isoferritine im pH-Bereich ist gut mit der Polyacrylamid-Fokussierung vergleichbar, die Bandenmuster stellen sich völlig unterschiedlich dar.

Abb. 21: Immundiffusionsuntersuchung der Leberferritin-Fraktion C48/3 im Auftrag gegen Anti-Albumin (A-Alb), Anti-Ferritin (A-Ferr. Nr. 59 PA/3) und Antihumanserum. Es zeigte sich nur eine Reaktion mit dem Ferritinantikörper.

Bei der präparativen Isoelektrofokussierung wurden jeweils 3 ml Leberferritin aus der zweiten Präparation mit einer Ferritinmenge zwischen 7 und 19mg pro Lauf (8 Läufe insgesamt) aufgetragen, die 7,8 mg C48/3-Herzferritin der 2. Präparation wurden gemeinsam in einem Lauf aufgetrennt. Abb. 22 zeigt zwei Beispiele eines Papierabdruckes von der Geloberfläche nach Beendigung des präparativen Laufes und die Zuteilung der Banden zu den Fraktionen I (=sauer) bis IV (=alkalisch), welche dann getrennt über Nylonfilter mit Aqua bidest. aus dem Gel ausgespült und über eine Sephadex G 50-fine-Säule von den Ampholyten getrennt wurden. In dem granulierten Gel waren während der Fokussierung scharf voneinander abgetrennte Banden entstanden, die mit den Ergebnissen der analytischen Fokussierungen gut vergleichbar waren. Das Ergebnis der Ferritinbestimmung in 30 ausgestanzten konsekutiven Gelfraktionen im Vergleich zum Bandenmuster des Papierabdruckes ist in Abb. 23 veranschaulicht. Die intensiver gefärbten Banden entsprachen dabei den Fraktionen mit den hohen Proteinkonzentrationen.

Abb. 24 und 25 zeigen analytische Fokussierungen von Leber- und Herz-Isoferritinen nach präparativer Reinigung: Die Leberisoferritin-Fraktionen I-IV fokussierten deutlich abgestuft in dem pI-Bereich, den das Gesamt-Leberferritin umfaßte, die Herz-Isoferritinfraktionen wirkten noch schärfer abgetrennt und überlappten so gut wie nicht mehr (pI 4,7-5,6). Das aufgetragene Lungenkarzinom-Ferritin enthielt ebenfalls geringe Anteile sauren Ferritins bis pH 4,7. Fraktion I und II des Herzferritins waren sehr knapp abgetrennt worden, um möglichst wenig Verunreinigung durch L-Ketten zu erhalten.

Die Ferritinausbeute schwankte je nach Qualität der Auftrennung (Anteil des nicht-trennbaren Ferritins, das an der Auftragsstelle liegengeblieben war) nach der G 50-fine Chromatographie zwischen 36 und 66%, ausgehend von der Proteinmenge vor der Fokussierung. Herzferritin-Fraktion I und II enthiel-

ten zusammen 0,4 mg saures Ferritin (Messung mit Gesamtfer-
ritin-RIA), das entspricht 2% der Ausgangsmenge von 22,5mg
Herzferritin. Spätere Messungen mit dem sauren Ferritin-RIA
ergaben jedoch 1,3 mg in der sauersten Fraktion HHF I alleine,
was 5,8% der Ausgangsmenge entspricht. Die Hälfte beider
Fraktionen wurde zur Immunisierung eines Hasen zur Gewinnung
von Antikörper Nr. 60 verwandt. Die Restfraktion I diente
zur Herstellung saurer Standards, Tracer, Immundiffusionsun-
tersuchungen und zu analytischen Fokussierungen.

Der Reinheitsnachweis der Fokussierungsfraktionen wurde mit-
tels Immundiffusion und Gelelektrophorese mit hochempfindli-
cher Silberfärbung geführt (Abb 26 und 27). Die Fraktion
IEF IV reagierte dabei nur noch mit Ferritin-Antiserum, im
Gegensatz zur Ferritinfraktion C48/3 vor der präparativen
Trennung. Die Elektrophorese wies bei den Fraktionen Leber-
Ferritin IV und Herzferritin I lediglich Verunreinigungen
durch Polymere von Ferritin auf (MG ungefähr 800 000 und
mehr). Die Qualität der Auftrennung in spezifisch saure oder
alkalische Isoferritine wurde in einer Immundiffusionsunter-
suchung geprüft (Abb. 28). Im Ansatz gegen den monoklonalen
Antikörper 2A4 gegen saures Ferritin ergaben Herzferritin-
Fraktion I und II (HHF I, II), nicht jedoch alkalisches Le-
berferritin eine Präzipitationslinie.

Zur Darstellung der Verteilung der Untereinheiten in den ein-
zelnen Fraktionen wurde eine Aufspaltung in die Untereinhei-
ten mit anschließender Gradienten-Gelelektrophorese und La-
ser-densitometrischer Auswertung durchgeführt (Abb. 29 und
30). Es ließ sich eine prozentuale Zunahme der H-Ketten von
Herzferritin-Fraktion IV bis I von 12,2% auf 81,4% und ein ho-
her Anteil an L-Ketten in der Leberfraktion IV von 86,3% nach-
weisen. Die Banden der H- und L-Ketten lagen im Molekularge-
wichtsbereich 20 000 sehr dicht nebeneinander.

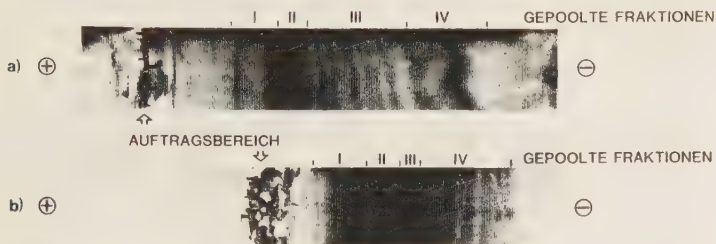
Die alkalische Leberferritin-Fraktion IV wurde zur Abtrennung der Polymere noch einer hochauflösenden HPLC-Gelpermeations-Chromatographie Ultropac TSK G-4000 unterworfen (Abb. 31). Die Rechromatographie der Monomerenfraktion des ersten Laufes zeigte im zweiten Lauf nur noch geringe Anteile von Polymeren, die Rechromatographie der Polymere ergab noch geringe Reste an Ferritin-Monomeren. Etwa 3 mg der Monomeren-Fraktion wurden an Sepharose 4B für die folgende Immunadsorption des Antikörpers Nr. 60 gekoppelt (= C-fer alk. II).

Aufgrund der hohen Reinheit der Fokussierungsfractionen wurde, um Verfälschungen durch Ferritin-RIAs mit Antikörpern unterschiedlicher Spezifität zu vermeiden, zur Bestimmung der Ferritinkonzentration auch der Eiweißgehalt nach Lowry gemessen. Da das dabei verwandte Standardprotein möglichst dem zu messenden Protein entsprechen sollte, wurden drei Standardproteine verglichen. Abb 32 zeigt die Standardgeraden von Albumin, Ferritin und γ -Globulin: Im unteren Konzentrationsbereich waren die Unterschiede der Extinktionen identischer Proteinkonzentrationen gering, oberhalb 0,4 mg/ml ergab der Albuminstandard eine höhere Extinktion als die beiden anderen Proteine. Die Standardkurve von lyophilisiertem Pferdemilz-Ferritin verlief deutlich flacher, d.h. der Proteingehalt von Proben wurde relativ höher bewertet. Weitere Ferritinbestimmungen nach dem Eiweißgehalt wurden daraufhin in hochgereinigten Fraktionen einheitlich mit γ -Globulinstandards durchgeführt.

PRÄPARATIVE ISOELEKTROFOKUSSIERUNG (pH 4 - 6) VON GEREINIGTEN FERRITINEN IN GRANULIERTEM GEL

a - Herzferritin NHEARTS C48I/3, Auftrag 3ml, Proteinkonzentration 5mg/ml → Papierabdruck

b - Leberferritin NLIVES II C48I/3, Auftrag 3ml, Proteinkonzentration 6mg/ml → Papierabdruck



FOKUSSIERUNG : GRANULIERTES GEL 5% (W/V), (Ultradox, LKB NR.2117-510)
AMPHOLINE pH 4-6:2% (W/V) (FA.LKB)

START	ENDE
250 V	1100 V
11mA	6mA
2,75 W	6,6 W

LAUFZEIT : 14-16h bei 10° C

PAPIERABDRUCK

FIXIEREN : 20% TRICHORESSIGSÄURE (10 min)

FÄRZEN : PERCHLORSAURE - COOMASSIE -BLAU-LOSUNG (30 min)

ENTFÄRZEN : EISSESSIG-METHANOL-LOSUNG

Abb. 22:

PRÄPARATIVE ISOELEKTROFOKUSSIERUNG (pH 4 - 6) VON GEREINIGTEM LEBERFERRITIN IN GRANULIERTEM GEL

a - Papierabdruck am Ende der Fokussierung

b - quantitative Ferritinmessung im Radioimmunoassay

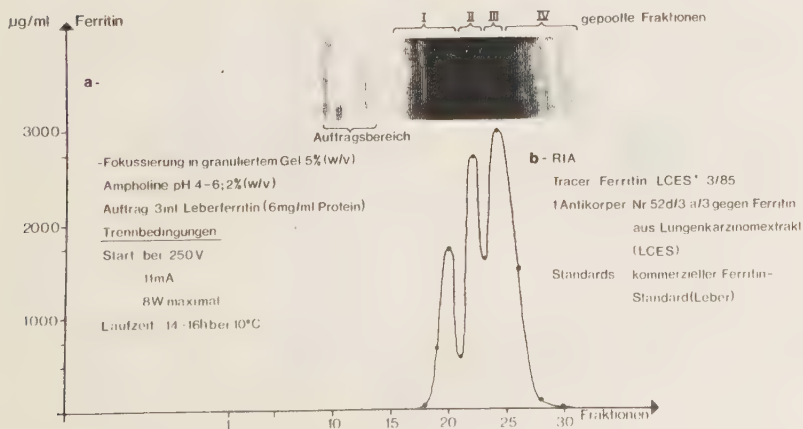


Abb. 23:

Abb. 22: Ein Papierabdruck von der Geloberfläche unmittelbar nach der präparativen Fokussierung von Herz- (a) und Leberferritin (b)- Fraktion C48/3. Die Banden sind gut voneinander abgegrenzt und entsprechen den Mustern in der analytischen Polyacrylamidfokussierung.

Abb. 23: In den 30, mit einem Metallgitter ausgestanzten, Fraktionen des Gels wurde mit dem Gesamtferritin-RIA der Ferritingehalt bestimmt und in einem Diagramm parallel zum Papierabdruck aufgetragen. Man sieht die gute Übereinstimmung zwischen den sichtbaren Banden und den gemessenen Konzentrationen.

ANALYTISCHE ISOELEKTROFOKUSSIERUNG VON HUMANEN GEWEBSFERRITINEN (POLYACRYLAMID, 5%, pH 4,0-6,5)

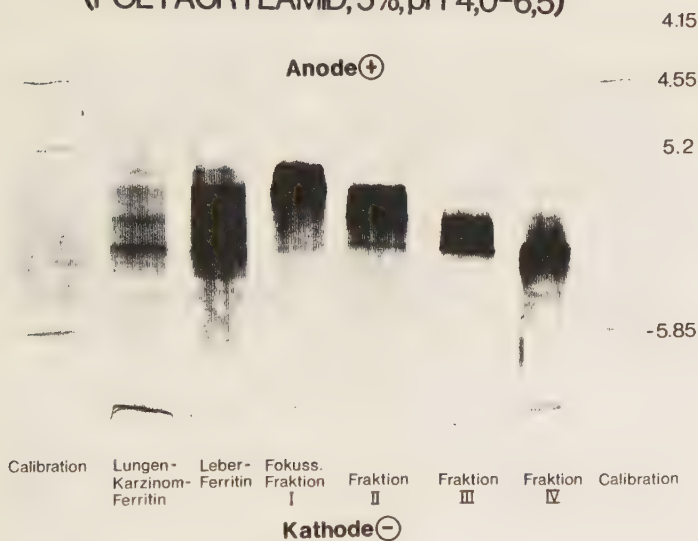


Abb. 24:

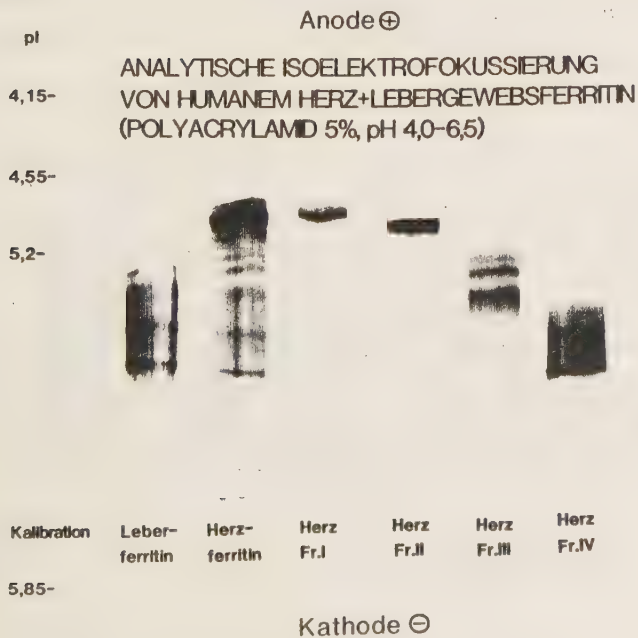


Abb. 25:

Abb. 24: Analytische Isoelektrofokussierung der Leberferritin-Fractionen nach Präparativer Auftrennung im Vergleich mit Leber-Gesamtferritin und einer Lungenkarzinom-Ferritinprobe. Die Leber-Isoferritine stellen sich deutlich abgestuft dar, das Lungenkarzinomferritin enthält auch geringe Anteile sauren Ferritins bis pI 4,7 (5%iges Gel, Ampholyte pH 4-6,5)

Abb. 25: Analytische Isoelektrofokussierung in 5%igem Polyarylamidgel (Ampholyte pH 4-6,5). Auftrennung der Herz-Isoferritine nach präparativer Trennung im Vergleich mit Gesamtherz-Ferritin und Gesamtleber-Ferritin. Fraktion I stellt die sauerste, Fraktion IV die alkalischste Fraktion dar. Die Isoferritine stellen sich scharf abgetrennt und überlappungsfrei dar. Fraktion I und II wurden sehr knapp abgetrennt.

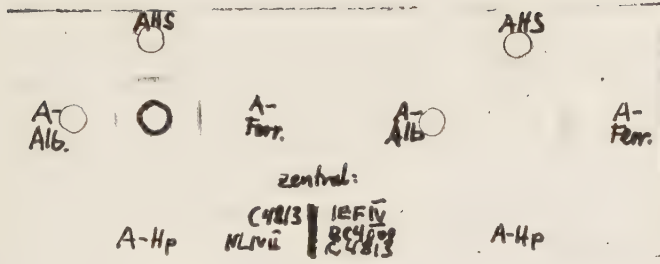


Abb. 26:

POLYACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESE VON GEREINIGTEM HUMANEN HERZ- UND LEBERGEWEBSFERRITIN

(6% iges Gel, Silberfärbung)

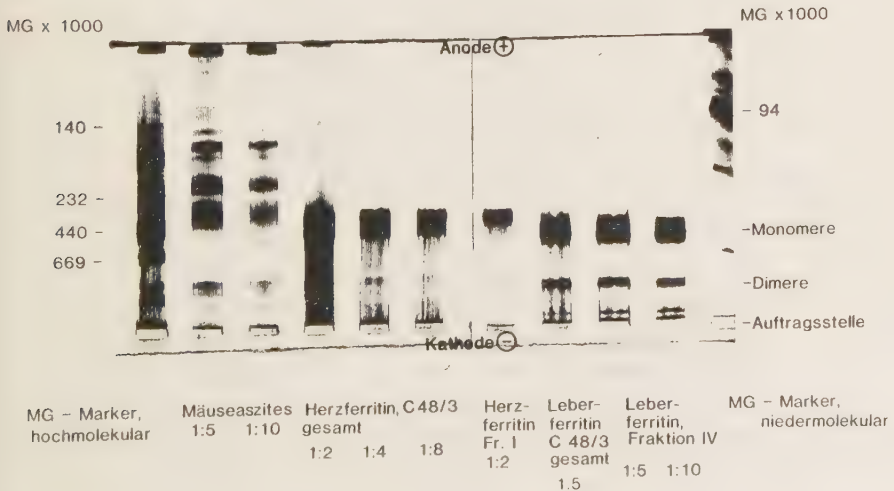


Abb. 27:

Abb. 26: Immundiffusionsuntersuchung von Leberferritin-Fraktion C48/3 und Isoelektrofokussierungs-Fraktion IV im Auftrag gegen Anti-Albumin (A-Alb), Anti-Ferritin (A-Ferr), Anti-Haptoglobin (A-Hp) und Anti-Humanserum (AHS). IEF IV reagierte nur noch mit dem Ferritinantikörper. Im Gegensatz dazu reagierte das Leberferritin vor der präparativen Auftrennung (C48/3) noch mit Antihumanserum und Anti-Albumin.

Abb. 27: Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Gesamtherz- und Gesamtleber-Ferritin, den Fraktionen C48/3 und den Isoelektrofokussierungs-Fraktionen HHF I und HLF IV. Am Rand liefen Mäuseaszites und Molekulargewichtsmarker zum Vergleich. Das Gel wurde nach der Trennung mit Silber gefärbt. HHF I 1:2 und HLF IV 1:5 und 1:10 sind nur noch durch Moleküle mit einem MG über 700 000 Daltons, wahrscheinlich Ferritinpolymere verunreinigt.

HHFI
2A-4 MAK
HHFII
HLFIV

Abb. 28:

SDS-Gradienten-Elektrophorese (T-4-22,5%) von gespaltenem hum. Leber- u. Herzferritin

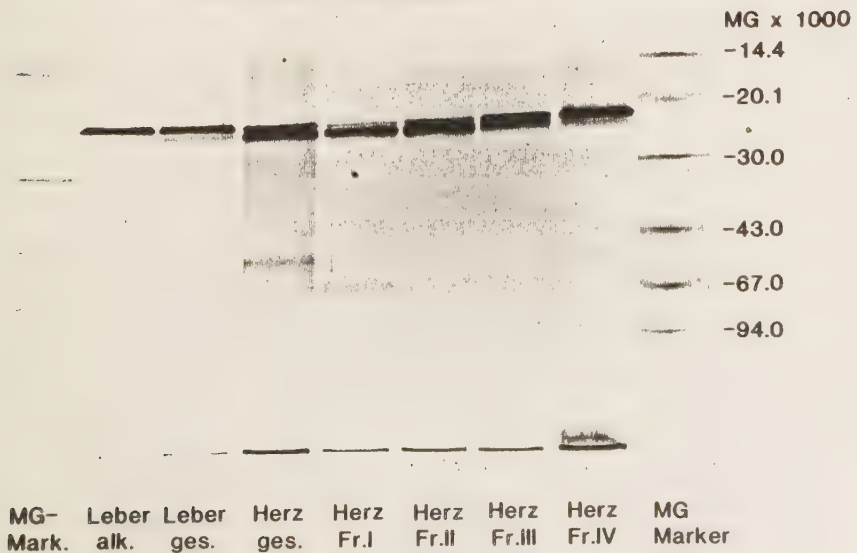
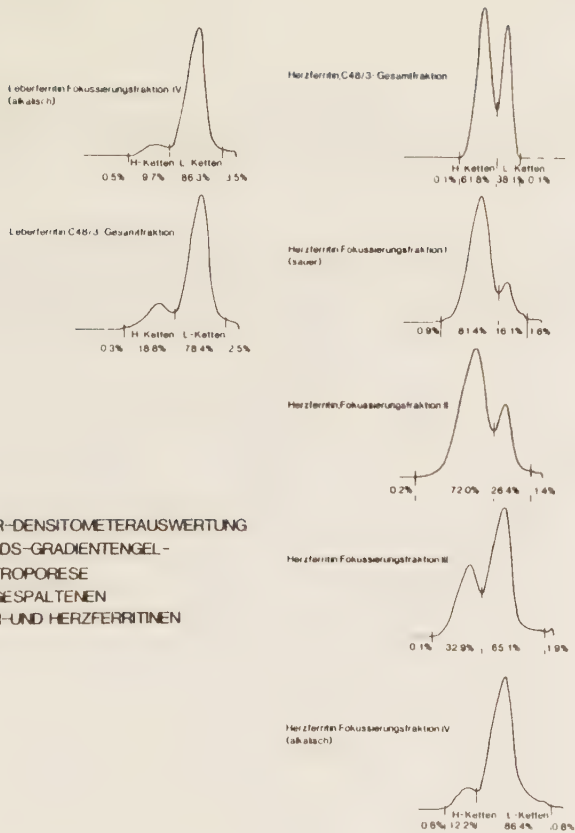


Abb. 29:

Abb. 28: Immundiffusionsuntersuchung von Isoferritinen im Ansatz gegen einen monoklonalen Antikörper (2A4) gegen saures Herzferritin. Nur die beiden saueren Herzferritin-Frak-tionen HHF I und II zeigten eine Reaktion damit, die alkalische Leberferritin-Frak-tion ergab keine Präzipitationslinie.

Abb. 29: Gradienten-Gelelektrophorese von Leber- und Herz-Gesamtferritin, alkalischer Leberferritin-Fraktion, den vier Isoferritinen von Herzferritin nach Auf-spaltung in die Untereinheiten. Rechts und links außen sind Molekulargewichtsmarker zu sehen. Die beiden jeweils sehr eng nebeneinander im MG-Bereich 20 000 liegenden Banden stellen die H- (unten) und die L- (oben) Ketten dar. Die alkalische Leberfrak-tion besitzt die relativ meisten L-Ketten, die Herz-fraktion I die relativ meisten H-Ketten.



LASER-DENSITOMETERAUSWERTUNG
DER SDS-GRADIENTENGEL-
ELEKTROPOROSE
VON GESPALTENEN
LEBER-UND HERZFERRITINEN

Abb. 30:

HPLC-CHROMATOGRAPHIE VON ALKALISCHEM LEBERFERRITIN

- 1 Chromatographie der alkalischen Leberfraction IEF IV (nach Isoelektrofokussierung)
- 2 Rechromatographie der Monomere von 1
- 3 Rechromatographie der Di- und Trimere von 1

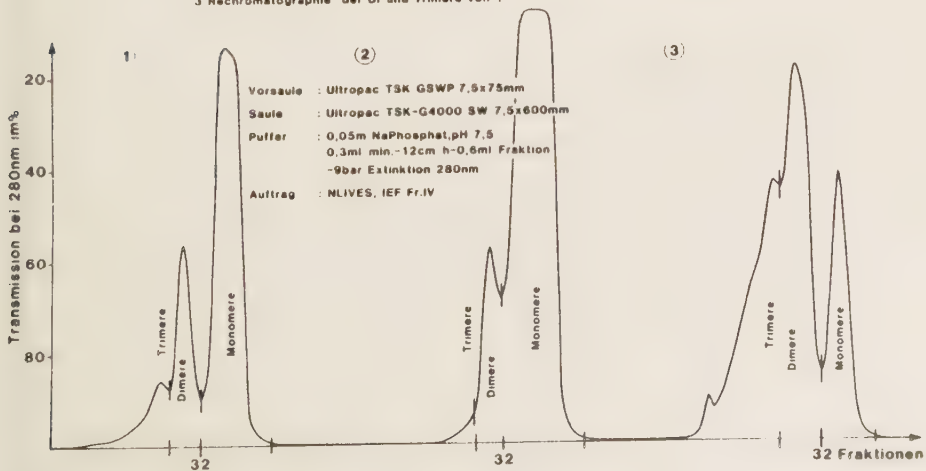


Abb. 30: Die Abbildung zeigt die Laser-Densitometerauswertung des Gels von der Gradienten-Gelelektrophorese der Isoferritin-Untereinheiten (vorige Abb.). Der Anteil der H-Ketten nimmt von Herzferritin-Fraktion IV zu Fraktion I kontinuierlich zu (von 12,2% auf 81,4%), die alkalischste Leberferritin-Fraktion IV enthält in etwa ebensoviel L-Ketten wie die Herzferritinfraktion IV, diese hat jedoch noch einen höheren Anteil an H-Ketten (12,2% zu 9,7%). Man sieht jedoch auch, daß die Gesamtherzferritin-Fraktion noch über 35% L-Ketten enthält, und selbst die Fraktion I und II enthalten noch 16,1 bzw. 26,4% L-Ketten.

Abb. 31: HPLC-Chromatographie von alkalischem Leberferritin nach präparativer Isoelektrofokussierung. Die linke Kurve zeigt das typische Bild mit Auftrennung von HLF IV in Mono-, Di-, und Trimere. Kurve 2 veranschaulicht die Rechromatographie der Monomere, Kurve 3 die der Polymere. Es war jeweils eine starke Anreicherung zu verzeichnen.

STANDARDREIHEN MIT VERSCHIEDENEN STANDARDPROTEINEN FÜR DIE QUANTITATIVE EIWEISSBESTIMMUNG NACH LOWRY

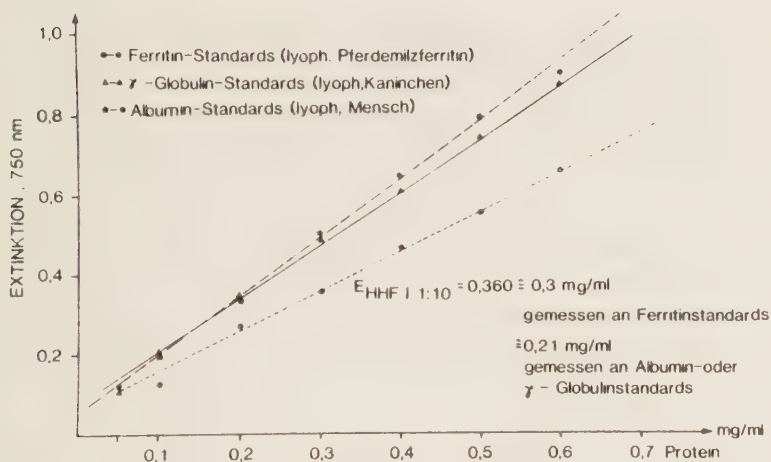


Abb. 32:

Abb. 32: Quantitative Eiweißbestimmung nach Lowry. Vergleich verschiedener Standardproteine, welche von lyophilisiertem Material einzeln abgewogen wurden. Die Steigung der Ferritin-Standardkurve ist deutlich geringer, der Eisenanteil des Proteins scheint beim Abwiegen einen Fehler zu verursachen. Im Konzentrationsbereich bis 0,4 mg/ml ergaben sich kaum Unterschiede bei der Verwendung von Albumin- oder γ -Globulin-Standards. Ferritineiweißmessungen wurden in der Folge einheitlich mit γ -Globulinstandards durchgeführt.

Herstellung von Antiseren

Es wurden zwei Kaninchen mit gereinigtem Gesamt-Herzferritin (Antikörper Nr. 59) bzw. mit der Hälfte der sauersten Herzferritinfraktionen I und II (Antikörper Nr. 60) immunisiert. Eine Woche nach Beendigung der Immunisierung wurde eine Blutprobe entnommen und im Ouchterlony-Test untersucht. Abb. 33 und 34 zeigen solche Immundiffusions-Untersuchungen von Serumproben verschiedener Abnahmedaten der Antikörper(AK) Nr.59, Nr. 60 und 51 (Anti-alkalisches Lungenkarzinom-Ferritin) im Ansatz gegen Herz- und Leberferritin-Fraktionen. Antiserum Nr. 59 zeigte identische Präzipitationslinien, Antiserum Nr.60 vom 3.2. angedeutet eine Spornbildung zwischen saurem und alkalischem Ferritin (Abb. 33), welche beim Antiserum Nr. 60 vom 18.2. (Abb. 34) ganz deutlich ausgebildet war. Es enthielt demnach spezifische Antikörperanteile gegen saures Ferritin. Antiserum Nr. 51 zeigt in Abb. 33 eine Doppellinie gegenüber Herzferritin, aber keine Spornbildung.

Die Kaninchen wurden nach dem positiven Ausfall dieser Testungen entblutet, wobei 80 bis 100 ml Serum pro Tier gewonnen werden konnten. Nach Absorption mit lyophilisiertem Normalserum wurde die reine IgG-Lösung der Antiseren durch Chromatographie auf einer Protein-A-Säule gewonnen. Abb. 35 und 36 veranschaulichen die Elutionskurven typischer Chromatographie-Läufe. Fraktion Protein-A/3 (PA/3) entspricht dabei dem gebundenen und wieder eluierten Immunglobulin G. Es wurden bei der Vielzahl der Läufe zwei verschiedene Elutionspuffer getestet, die Ergebnisse waren identisch.

Immunad/-desorptionsstudien

Um die Spezifität der beiden Antikörper zu erhöhen, wurde jeweils eine Adsorption an CNBr-aktivierte Sepharose-4B, an die

die alkalischste Leberferritin-Fraktion gekoppelt worden war (=C fer alk. I und II), durchgeführt (Abb. 37). Die nichtgebundene Fraktion 1 sollte im Idealfall Antikörper gegen saures Ferritin, die gebundene und dann durch Pufferwechsel eluierte Fraktion 3 nur Antikörper gegen alkalisches Ferritin enthalten. Nach dieser Immunadsorption wurden die Antikörper wieder nach Ouchterlony getestet (Abb. 38-41): Sowohl Fraktion C-fer alk. I/1 als auch C-fer alk. I/3 von Antikörper Nr. 59 reagierten völlig identisch mit Herzferritin (C48/3; HHF I) und Leberferritin (HLF I, IV; NLIVS III). Antikörper Nr. 60 C-fer alk. II/3 hingegen zeigte eine deutliche Spornbildung zwischen saurem Herz- (HHF-IEF I) und alkalischem Leberferritin (NLIV-IEF IV) (Abb. 40) und auch zwischen saurem und alkalischem Herzferritin (Abb. 41). Das bedeutet, daß ein bestimmter Anteil der Antikörperfraktion C-fer alk. II/3 nur mit saurem Ferritin reagierte, es also immunologisch von alkalischem Ferritin unterscheiden konnte.

Neben der Spornbildung ergaben sich auch deutliche Doppellinien gegen HHF IEF IV und HLF IEF IV (außen schwach, innen stark), von welchen sich nur die äußere gegenüber HHF IEF I fortsetzte und sich dabei verstärkte. Die Doppellinien gegen Leber-Gesamtferritin (HLF Σ) waren in etwa gleich kräftig ausgebildet. Eine mögliche Erklärung für diese Erscheinung wäre, daß die äußere Linie den H-Ketten, die innere den L-Ketten entspricht.

Die Fraktion C-fer alk II/1 des AK Nr. 60 reagierte ausschließlich mit saurem Herzferritin (Linie sehr schwach) und nicht mehr mit alkalischem Leberferritin (Abb. 40).

Die Untersuchung eines Antikörpers gegen menschliches Herzferritin von Dr. Worwood (A-HHF HT 10) nach Adsorption an die Säulen C-pp₂-Ia (alkalisches Plazenta-ferritin angekoppelt) und C-pp₂-Id (saures Plazenta-ferritin angekoppelt) er-

gab eine Doppellinie gegen alkalisches Leberferritin (angeduetet auch gegen alkalisches Lungenkarzinom-Ferritin), aber keine Spornbildung gegenüber saurem Herzferritin (Abb. 42).

Radioimmunoassay

1. Markierung und Reinigung des markierten Antigens

Bei der Markierung nach Bolton und Hunter wurden 10 oder 20 µg saures Herzferritin, alkalisches Leberferritin oder Gesamtferritin aus Lungenkarzinomen eingesetzt (Abb. 43-45). Bei der Chromatographie auf dem HPLC-Ultro Pac TSK G-4000 SWG-System erschien zuerst ein kleiner Peak, gleichzeitig bei der Extinktions- und der Aktivitätsmessung, welcher dem markierten Protein entsprach. Es wurden durch den Einbau der Radioaktivität spezifische Aktivitäten von 10, 8, 20 und 50 µCi/µg Protein erzielt. Der zweite, sehr große Peak in der Aktivitätskurve ohne Ausschlag bei der Absorptionsmessung enthielt das nicht konjugierte ¹²⁵J-Bolton-Hunter-Reagenz. Die Fraktionen des ersten Peaks wurden vereinigt und in den Antikörper-Verdünnungsreihen auf ihre Verwendbarkeit im RIA getestet. Sie wurden mit dem Elutionspuffer auf eine Aktivität von 0,2 mCi/ml verdünnt, die im RIA eingesetzten 100 µl pro Teströhrchen ergaben dabei zwischen 25000 und 30000 Counts.

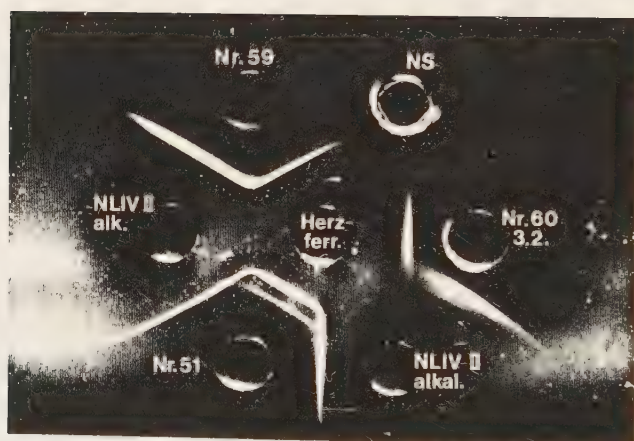


Abb. 33:

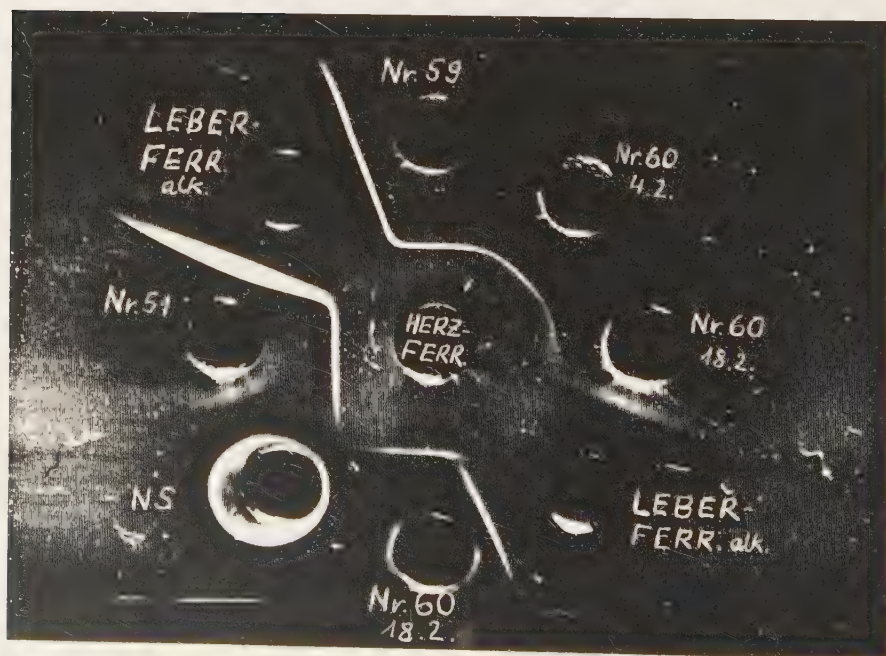


Abb. 34:

Abb. 33: Immundiffusionsuntersuchung (nativ, Dunkelfeld) von Antiserum Nr. 51 (gegen alkalisches Lungenkarzinom-Ferritin), Nr. 59 (gegen Gesamt-Herzferritin) und Nr. 60 (gegen saures Herzferritin) im Ansatz gegen saures Herzferritin Fraktion I und alkalisches Leberferritin (NLIV II alk). Antikörper Nr. 59 zeigt identische, AK Nr. 60 Präzipitationslinien mit angedeuteter Spornbildung zwischen saurem und alkalischem Ferritin. AK Nr. 51 ergibt eine Doppellinie, aber keine Spornbildung gegenüber Herzferritin.

Abb. 34: Immundiffusionsuntersuchung (nativ, Dunkelfeld) der Kaninchen-Testseren Nr. 51, 59 und 60 von verschiedenen Abnahmedaten im Ansatz gegen alkalisches und saures Ferritin. Deutliche Spornbildung von AK Nr. 60 vom 18.2. (unten), d.h. es ergaben sich Hinweise auf spezifische Antikörperanteile gegen saures Ferritin.

PROTEIN A-IMMUNADSORPTION VON ANTI - FERRITIN SERUM

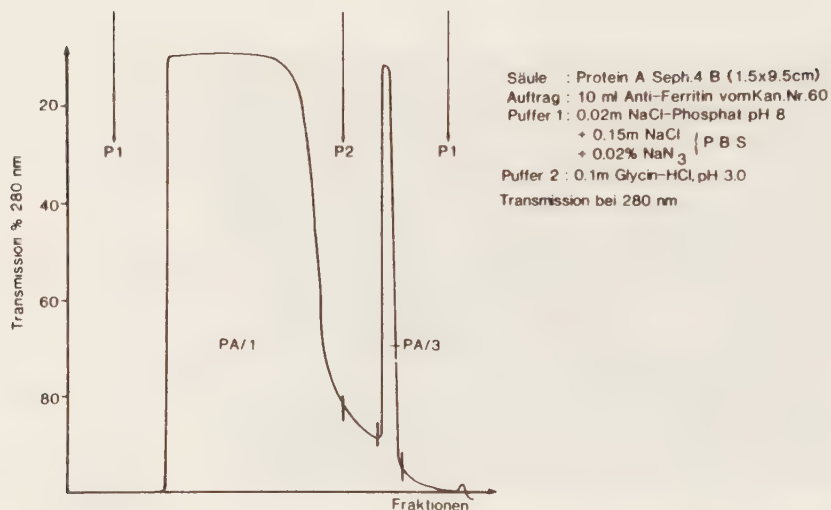


Abb. 35:

PROTEIN A-IMMUNABSORPTION VON ANTI-FERRITIN
 SERUM

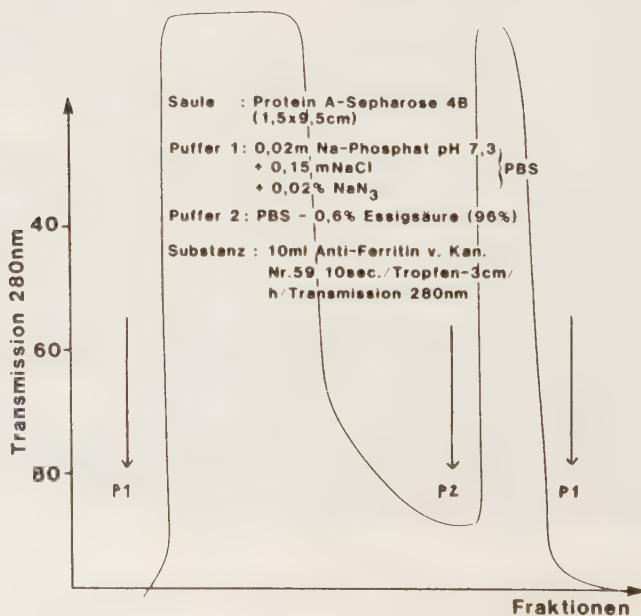


Abb. 36:

Abb. 35: Die Abbildung zeigt ein typisches Elutionsdiagramm des Antikörpers Nr. 60 nach Adsorption an eine Protein-A-Säule. Zur Elution der Globuline wurde ein 0,1 molarer Glycin-HCl-Puffer pH 3,0 verwandt. PA/3 enthielt das gesuchte Immunglobulin und wurde eingengt.

Abb. 36: Die Abbildung zeigt das entsprechende Diagramm der Protein-A-Adsorption des Antikörpers Nr. 59 gegen Gesamt-Herzferritin. Diesmal wurde der zweite Peak mit PBS-Puffer, der mit 0,6% Essigsäure versetzt worden war, eluiert. Der zweite Peak stellt wiederum die gesuchte Fraktion mit dem IgG dar.

IMMUNABSORPTION VON ANTI-FERRITIN SERUM

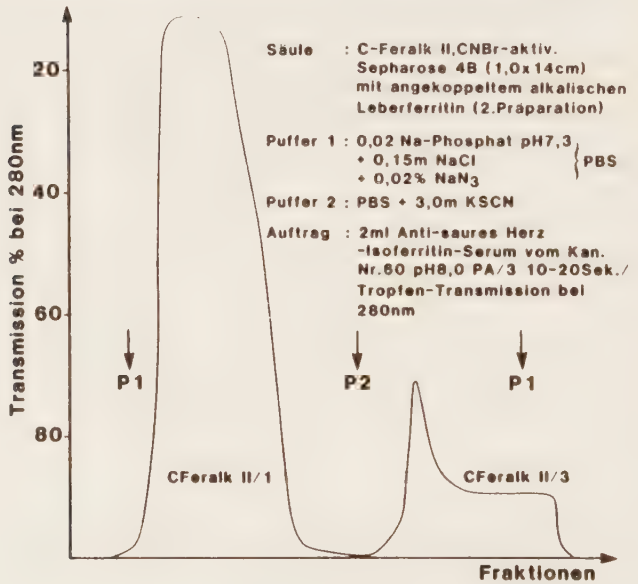


Abb. 37:

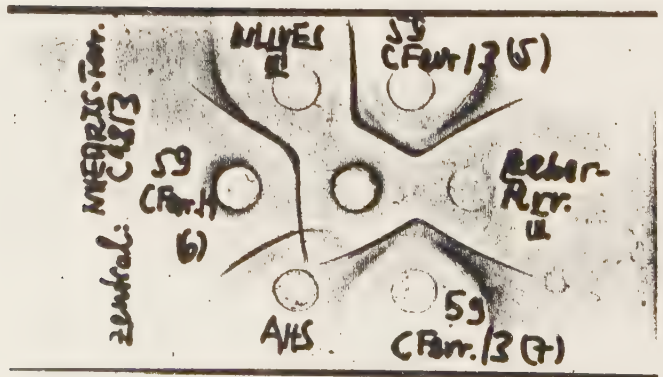


Abb. 38:

Abb. 37: Immunadsorption von Anti-Ferritinserum Nr. 60 pH 8 PA/3 an CNBr-aktivierte Sepharose-4B mit angekoppeltem alkalischen Leberferritin. Die Fraktionen C-fer alk. II/3 wurden gepoolt und eingeeengt. In den Fraktionen C-fer alk. II/1 war der Anteil des Antikörpers enthalten, der für saures Ferritin spezifisch war und deshalb nicht an die Säule gebunden hatte. Er wurde ebenfalls gesammelt.

Abb. 38: Immundiffusionsuntersuchung des Antikörpers Nr. 59 C-fer alk I/1 und 3 gegen Gesamt-Herzferritin (C48/3) und relativ alkalisches Leberferritin (NLIVES III). Die Präzipitationslinien gehen völlig ineinander über ohne Spornbildung. NHEARTS Ferr. C48/3 ist noch positiv in der Reaktion gegen Antihumanserum (AHS).

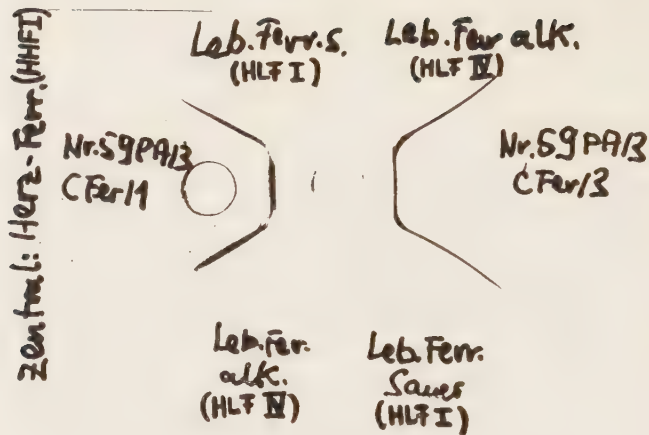


Abb. 39:

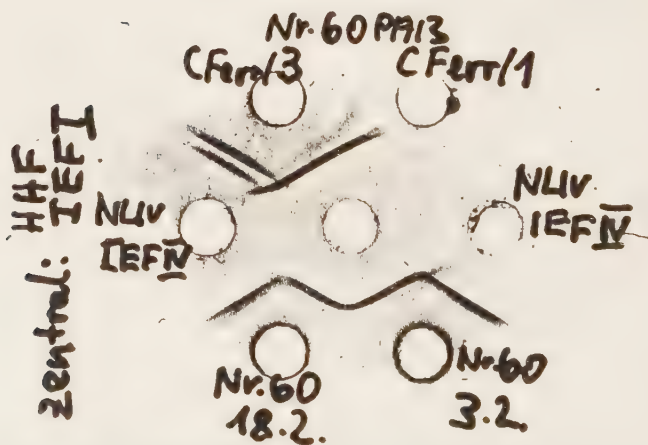


Abb. 40:

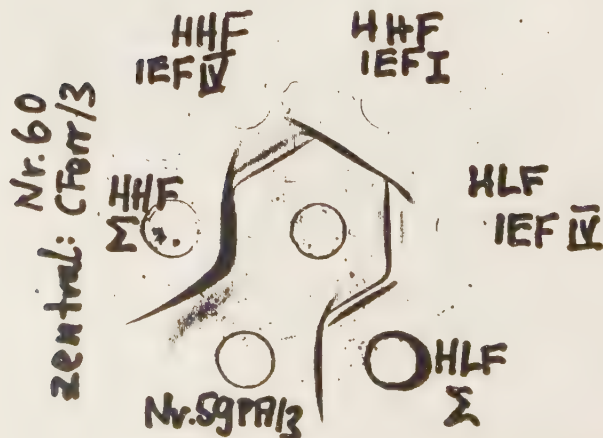


Abb. 41:

Abb. 39: Immundiffusionsuntersuchung von AK Nr. 59 C-fer alk. I/1 und C-fer alk. I/3 im Ansatz gegen saures und alkalisches Leberferritin (HLF I und IV) und gegen saures Herzferritin (zentral). Völlige Identität der Reaktionslinien. Zarte Doppellinie gegen saures Herzferritin.

Abb. 40: Immundiffusionsuntersuchung von AK Nr. 60 (nach Immunabsorption an Protein A, von verschiedenen Abnahmedaten, und nach Absorption an C-fer alk II) gegen die sauerste Herz- und die alkalischste Leberferritin-Fraktion. Fraktion C-fer/3 hat eine Doppellinie gegen Leberferritin ausgebildet und geht nicht in die Präzipitationslinie gegen Herzferritin (HHF IEF I, zentral) über. Fraktion C-fer/1 zeigt eine sehr schwache Linie gegen Herz- und keine Reaktion mit Leberferritin (NLIV IEF IV). Das Serum vom 18.2. zeigt völlige Identität, das vom 3.2. jetzt einen angedeuteten Sporn bei der Reaktion gegen Herzferritin.

Abb. 41: Immundiffusionsuntersuchung von AK Nr. 60 C-fer alk. II/3 zentral gegen Gesamt-Herzferritin (HHF Σ), alkalisches Herzferritin (HHF IEF IV), saures Herzferritin (HHF IEF I), alkalisches Leberferritin (HLF IEF IV) und Gesamt-Leberferritin (HLF Σ). Es besteht eine deutliche Doppellinie gegen HHF IEF IV, die äußere davon setzt sich in eine einzelne kräftige gegen HHF IEF I fort. Gegen HLF IEF IV ist die innere Linie kräftiger, gegen HLF Σ beide Linien gleich stark ausgeprägt. Beidseits zeigt sich ein deutlicher Sporn gegen das sauerste Herzferritin

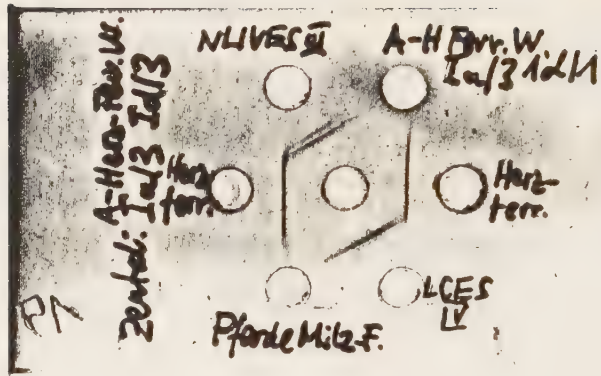


Abb. 42:

**^{125}J -MARKIERUNG VON GESAMTFERRITIN (LCES o.H.BC-DEAE III)
(BOLTON-HUNTER-METHODE)**

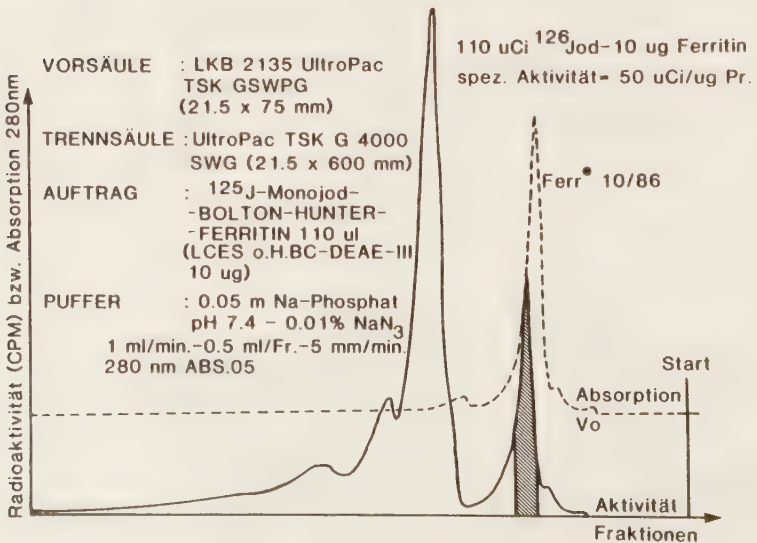


Abb. 43:

Abb. 42: Immundiffusionsuntersuchung eines polyklonalen Herzferritin-Antikörpers nach Absorption gegen saures (Ia/3 Id/3) und alkalisches Plazenta-Ferritin (Ia/3 Id/1) im Ansatz gegen Gesamtherz-Ferritin, Pferd milz-Ferritin, Lungenkarzinomferritin (sauer, LCES IV) und alkalisches Leberferritin (NLIVES III). Die Ia/3 Id/3-Fraktion (Mitte) zeigt eine Doppellinie gegen NLIVES III und angedeutet gegen LCES IV. Es ergibt sich keine Spornbildung gegen Herzferritin.

Abb. 43: Darstellung der ^{125}J -Markierung eines Gesamtferritins aus Lungenkarzinom mit Bolton-Hunter-Reagenz. Der erste Peak enthält das markierte Protein, der nachfolgende große Peak entspricht dem nicht-gebundenen Bolton-Hunter-Reagenz. Die spezifische Aktivität des Ferritins betrug $50 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ Protein.

**¹²⁵J-MARKIERUNG VON ALKALISCHEM LEBERFERRITIN (HLF IV)
(BOLTON-HUNTER-METHODE)**

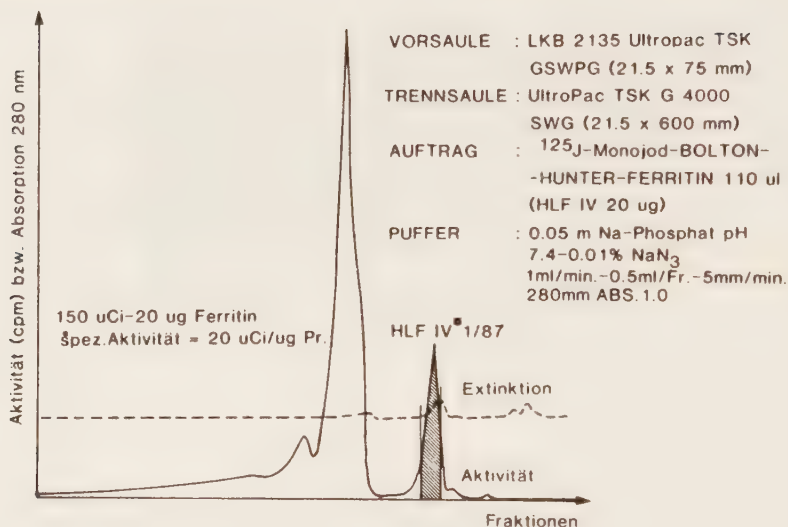


Abb. 44:

¹²⁵J-MARKIERUNG VON SAUREM HERZFERRITIN (HHF I) (BOLTON-HUNTER-METHODE)

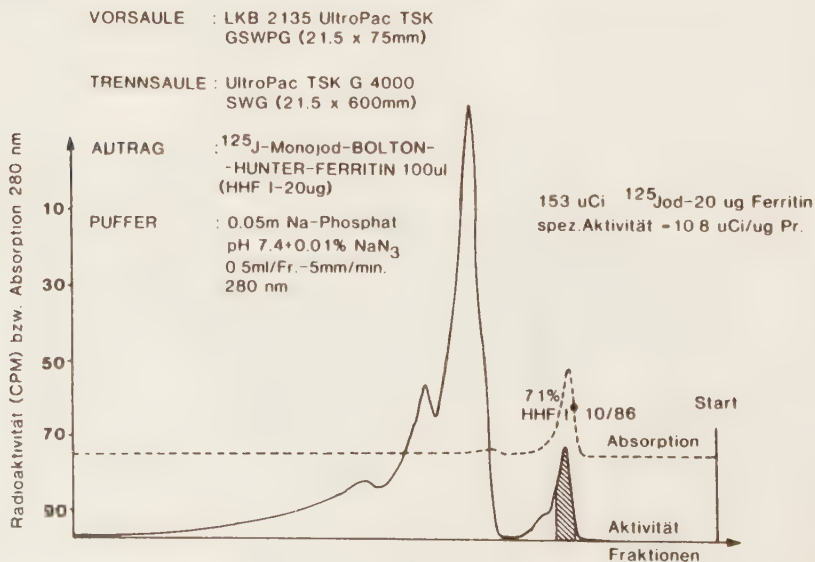


Abb. 45:

2. Antikörperverdünnungskurven

Bei den Antikörperverdünnungskurven wurden verschiedene Antikörper in geometrischen Verdünnungen mit saurem, alkalischem und Gesamt-Ferritintracer inkubiert (Abb. 46-48). Die getesteten Antikörper waren: AK Nr. 60 (Gesamtfraktion oder C-fer alk. II/1 oder C-fer alk. II/3), AK Nr. 59 (Gesamtfraktion oder C-fer alk/1), Nr. 49 (gegen alkalisches Plazentaferritin), Nr. 52 (gegen saures Lungenkarzinom-Ferritin) und Nr. 2A4 (monoklonal, gegen Herzferritin). Der beste Vergleichsparameter ist die Verdünnung, bei der der Tracer zu 50% gebunden wird (= 50%-Punkt).

Mit dem G E S A M T F E R R I T I N T R A C E R erreichten alle untersuchten polyklonalen Antikörper eine maximale Bindung zwischen 80 und 95%. Die Bindungskurven verliefen annähernd parallel. Der monoklonale Antikörper ergab keine Reaktion (Abb. 46). Die 50%-Punkte lagen bei Verdünnungen zwischen 1:65 000 (Nr. 52) und 1:187 000 (Nr. 59).

Mit dem A L K A L I S C H E N L E B E R F E R R I T I N - T R A C E R erreichten Antikörper Nr. 49, Nr. 52 und Nr. 60 C-fer alk/3 Bindungen zwischen 85 und 95%. Weniger stark reagierten die von der alkalischen Säule nicht absorbierten Anteile von Antikörper Nr. 59 und 60, deren Bindungskurven auch flacher verliefen. Der monoklonale Antikörper band den Tracer überhaupt nicht. (AK Nr. 60 C-fer alk/1 und AK Nr. 60 pH 8 C-fer alk/1 unterscheiden sich lediglich in der Absorption an die Protein-A-Säule, die bei letzterem mit PBS-Puffer pH 8 erfolgt war) (Abb. 47).

Den S A U R E N T R A C E R banden alle Antikörper (Abb. 48), und es wurden Bindungen zwischen 47 und 93% erreicht. Die Kurve von Antikörper Nr. 60 C-fer alk/1 verlief etwas steiler,

die von Antikörper Nr. 49 etwas flacher als die übrigen Kurven, welche in etwa die gleiche Steigung aufwiesen. Der saure Tracer war der einzige, mit dem der monoklonale Antikörper eine Reaktion zeigte.

Zusammenfassend kann man sagen, daß nur der monoklonale Antikörper und der AK Nr. 60 C-fer alk/1 pH 8 mit dem alkalischen Tracer nicht oder nur in geringem Prozentsatz reagieren und somit spezifisch für den sauren Tracer sind. In dem für den RIA verwandten Verdünnungsbereich von 1:2000 bis 1:5000 liegt die Bindung des AK Nr. 60 C-fer alk/1 pH8 an den alkalischen Tracer unter 5%.

Alle anderen Antikörper binden sowohl den alkalischen als auch den sauren Tracer, es gibt jedoch Unterschiede in der Spezifität:

Antikörper Nr. 49 (gegen alkalisches Plazentaferritin) und Nr. 52 (gegen saures Lungenkarzinom-Ferritin) reagieren stärker mit dem alkalischen, Antikörper Nr. 59 (gegen Gesamt-Herzferritin) und AK Nr. 60 C-fer alk/3 etwa gleich stark mit beiden Tracern. Dies ist ersichtlich an den Verdünnungen bei 50% Bindung des Tracers: Eine weniger hohe Verdünnung zeigt eine geringere Affinität des Antikörpers zu dem Tracer an.

Im RIA wurden die Antikörper in einer Verdünnung mit 35-40% Bindung an den jeweiligen Tracer eingesetzt.

ANTIKÖRPER-VERDÜNNUNGSKURVEN MIT GESAMT-LUNGENKARZINOMFERRITIN- TRACER (LCES-D-III)

Unspez. Bdg. N ~ 5%

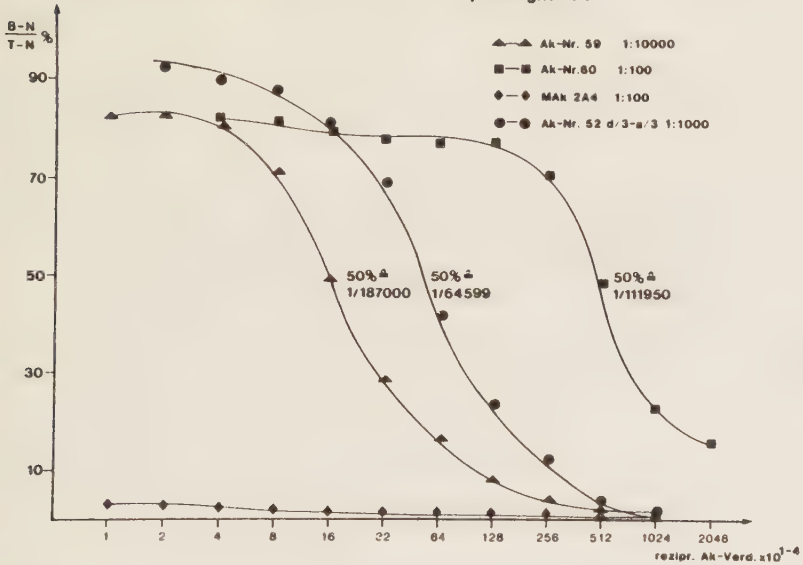


Abb. 46:

ANTIKÖRPER-VERDÜNNUNGSKURVEN MIT LEBERFERRITIN-TRACER (HLF IV)

unspez. Bdg. N zw. 2 u. 10%

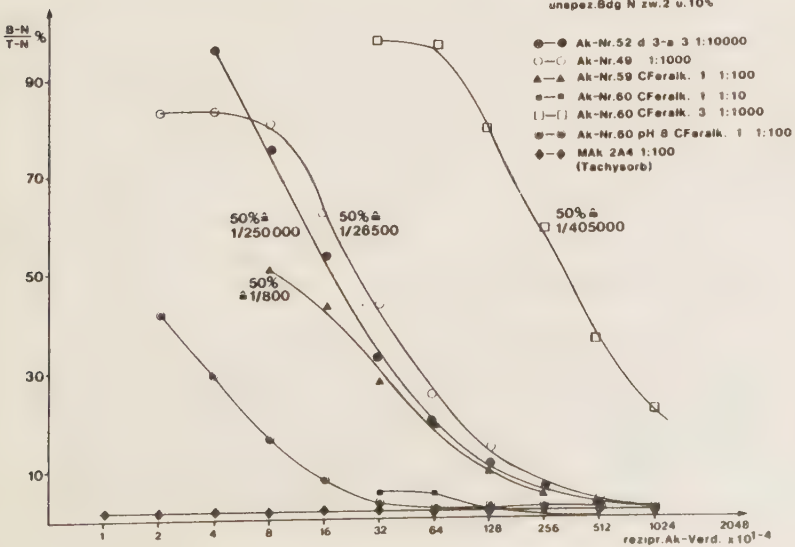


Abb. 47:

3. Standardkurven

Da kein internationaler Referenzstandard existiert, benutzten wir zur Eichung des RIA einen kommerziellen Ferritinstandard (Leber) der Fa. Becton&Dickinson in einem Bereich zwischen 5 und 500 ng/ml, einen sauren Standard, hergestellt aus der Herzferritinfraktion I, zwischen 1,25 und 320 AU/ml und geometrische Verdünnungsreihen der alkalischen Leberferritinfraktion IV. Der Umrechnungsfaktor von "arbitrary units" (AU) auf ng/ml Ferritineiweiß im eigenen sauren RIA beträgt "4" (HHF-Fraktion I enthält 1,5 mg/ml Eiweiß, Standard 8 entstand daraus durch Verdünnung 1:1200).

Als erster Antikörper dienten eigene Ferritin-Antiseren (Antikörper Nr.52 d/3 a/3; AK Nr. 60 C-fer alk/1 pH8) und der monoklonale Antikörper 2A4 in geeigneter Verdünnung.

Abb. 49 bis 55 zeigen die wichtigsten Standardkurven nach dem Logit-Log-Auswerteverfahren:

Im Gesamtferritin-RIA verdrängen alle drei Standards; die Geraden des alkalischen ($B = -2,65$) und des B&D-Standards ($B = -2,70$) verlaufen in etwa parallel, Die Steigung der sauren Standardgeraden ($B = -1,6$) ist signifikant niedriger, d.h. die sauren Standards verdrängen den Tracer aus der Bindung mit dem ersten Antikörper weniger stark. Die 50%-Punkte betragen 310 ng/ml für den sauren, 30 ng/ml für den B&D und 24ng/ml für den alkalischenStandard (Abb. 49).

Im Ansatz mit dem alkalischen Tracer (Abb.50) ergibt sich ebenfalls eine geringfügig flachere Inhibitionskurve mit den sauren Standards ($B = -1,84$), kommerzieller ($B = -2,63$) und alkalischer Standard ($B = -2.98$) verdrängen ähnlich gut. Die 50%-Punkte betragen für den sauren Standard 210 ng/ml und für den B&D-Standard 30 ng/ml).

Beim Testansatz mit dem sauren_Ferritintracer verlaufen die Standardkurven sehr unterschiedlich:

Abb. 51: Die Verdrängungskurven der sauren und alkalischen Ferritinfraktionen unterscheiden sich nur leicht in der Steigung ($B_s = -1,99$; $B_s = -1,84$; $B_a = -2,01$). Wesentlich ist jedoch, daß der alkalische Standard erst ab einer Konzentration von 200 ng/ml verdrängt. Der B&D-Standard verdrängt ab 75 ng/ml bis 500 ng/ml nicht über 10% des sauren Tracers.

Abb. 52: Hier wird sichtbar, daß die saure (HHF-I; $B = -2,08$) und die alkalische (HHF-IV; $B = -2,10$) Herzferritinfraktion parallele Standardgeraden ergeben, während die Fraktion HLF-IV von der Leber bei 1640 ng/ml nur knapp über 10% Tracer verdrängt. Der 50%-Punkt liegt beim sauren Herzferritin bei 125 ng/ml und beim alkalischen Herzferritin bei 2125 ng/ml, also um das 17-fache höher.

Abb. 53: Sie zeigt das Verhalten der sauren Standardkurven im sauren Assay bei Zusatz von 100 oder 200 µl ferritinfreien Serums (Fa. Behringwerke) zu den Standards. Die Geraden verlaufen parallelverschoben ($A = 2,67$; $A = 3,24$) ($B = -2,05$ bzw. $-1,95$), erhöhter Serumzusatz erhöht die Verdrängung identischer Standards.

Abb. 54: Verwendet man den monoklonalen 2A4-Antikörper als ersten Antikörper mit dem sauren Tracer, so ergibt sich, daß die sauren Standards erst ab Standard 3 (= 40 ng/ml) verdrängen. Die Standardkurve stellt sich als geknickte Gerade mit Zunahme der Steigung im höheren Konzentrationsbereich dar. Der kommerzielle und der alkalische Standard verdrängen nicht bis 500 bzw. 164 000 ng/ml.

Vergleicht man Abb. 49 bis 54, zeigt sich, daß der saure Standard erst in einer 2-3 fach höheren Konzentration im Gesamtferritin-RIA und im alkalischen RIA die gleiche Verdrängung erreicht wie im sauren Test (50%-Punkt von 310 ng/ml bzw. 210 ng/ml gegenüber 100-125 ng/ml).

Der kommerzielle Standard verdrängt im Gesamt- und alkalischen RIA gleich gut (50%-Werte 30 ng/ml), im sauren so gut wie nicht.

Den 60%-Wert erreicht der alkalische Standard im sauren RIA bei 32 800 ng/ml, der saure bei 60 ng/ml (= 15 AU), d.h. der saure RIA ist für saures Ferritin ca. 550 mal empfindlicher als für alkalisches Ferritin.

ANTIKÖRPER-VERDÜNNUNGSKURVEN VON SAUREM HERZFERRITIN-TRACER (HHF I)

unspez. Bdg N zw. 2 u. 10%

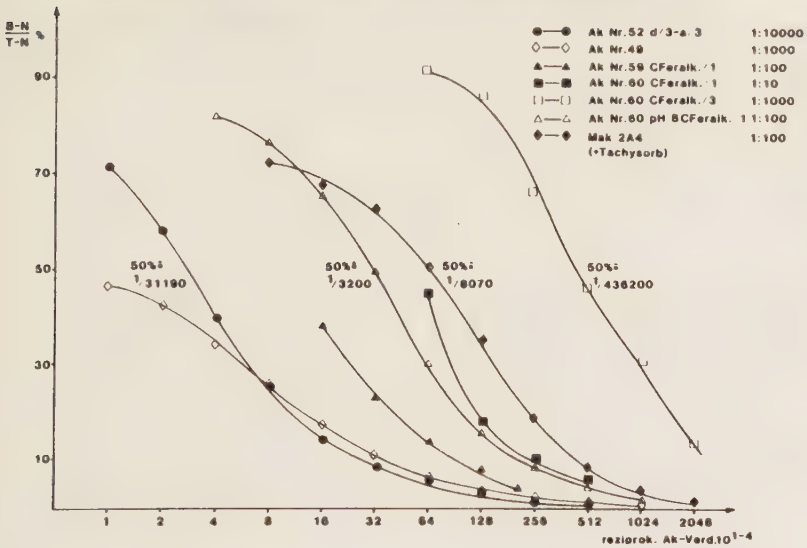


Abb. 48:

FERRITIN-RADIUMMUNOASSAY/STANDARD-INHIBITIONSKURVE

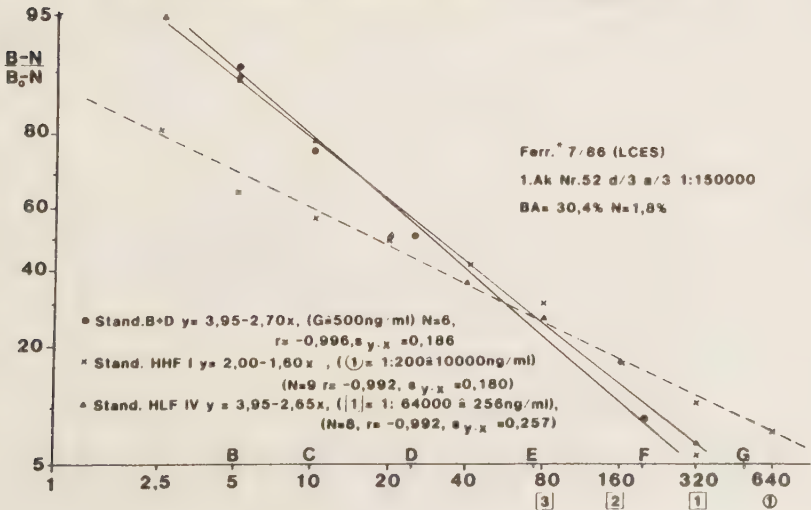


Abb. 49:

FERRITIN-RADIOIMMUNOASSAY/STANDARD-INHIBITIONSKURVE

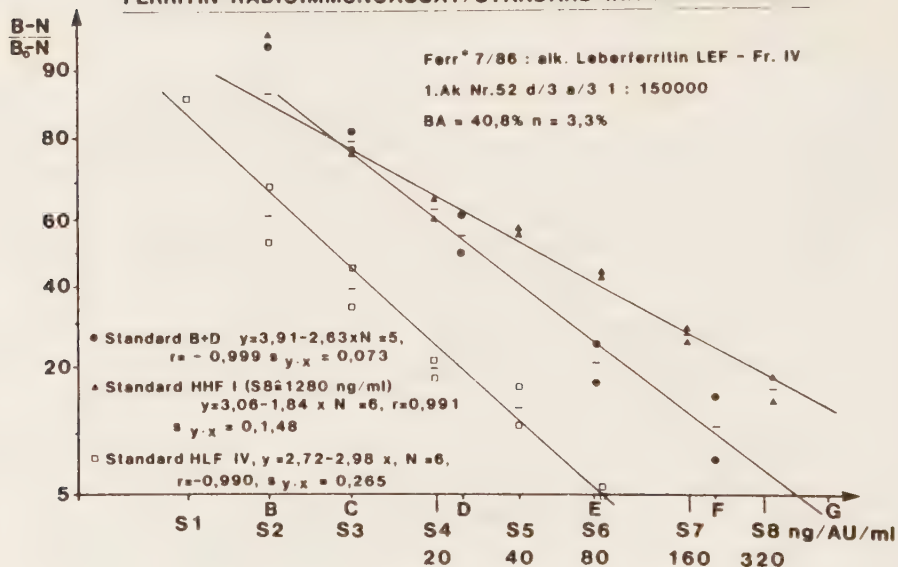


Abb. 50:

FERRITIN-RADIOIMMUNOASSAY/STANDARD-INHIBITIONSKURVE

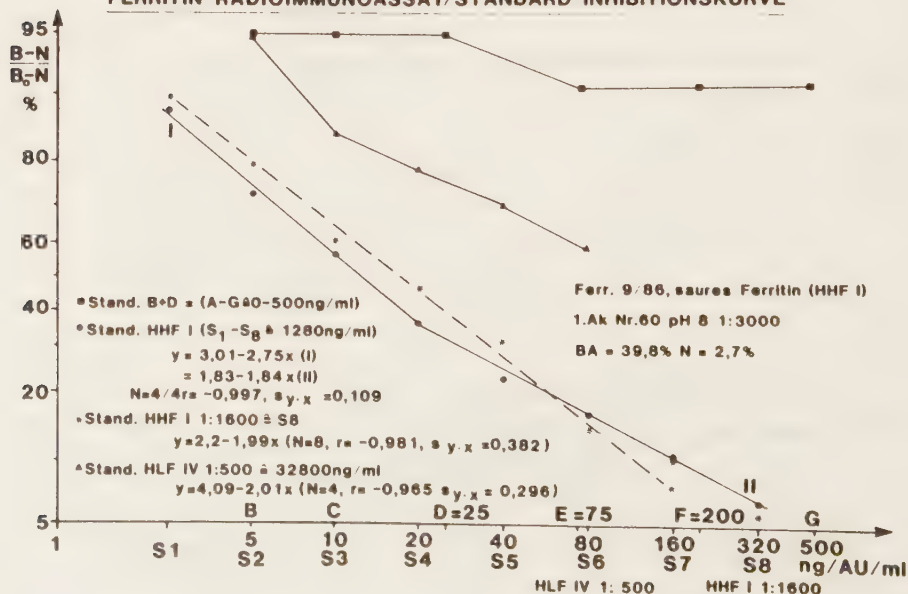


Abb. 51:

FERRITIN-RADIOIMMUNOASSAY/STANDARD-INHIBITIONSKURVE

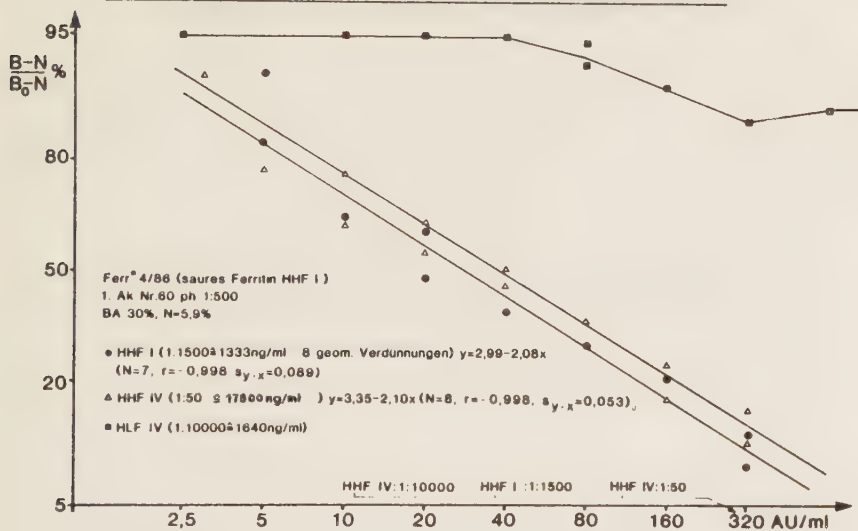


Abb. 52:

FERRITIN-RADIOIMMUNOASSAY/STANDARD-INHIBITIONSKURVE

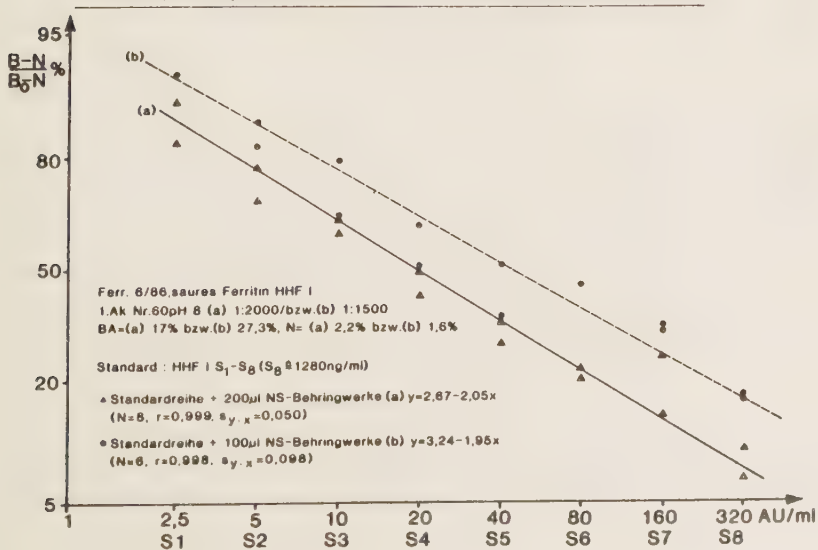


Abb. 53:

FERRITIN-RADIOIMMUNOASSAY/STANDARD-INHIBITIONSKURVE

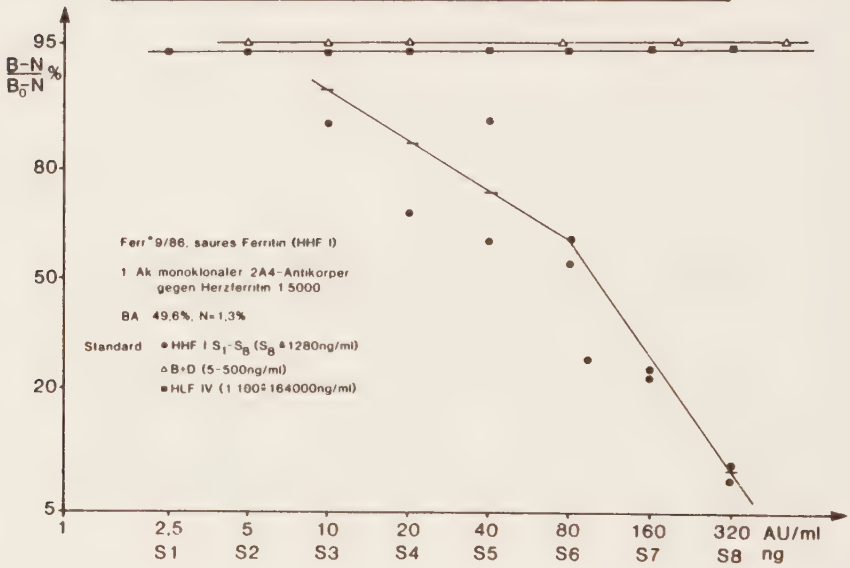


Abb. 54:

In Tabelle 3 sind sämtliche Einzelwerte von 23 Standardkurven und die wichtigsten Parameter des sauren Ferritin-RIA (Ferritin-S), wie Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten, aufgelistet. Ganz unten steht die Gleichung der Gesamt-Regressionsgeraden. Abb. 55 zeigt eine graphische Darstellung der Logit-Log-Auswertung dieser 23 Tests. Eingezeichnet ist die gemittelte Regressionsgerade aus 181 Standardpunkten mit der einfachen Standardabweichung. Der Korrelationskoeffizient r beträgt $-0,938$, die Streuung der Standardpunkte um die Gerade $0,490 (s_{y \cdot x})$.

Eine lineare Standardgerade wurde in der Logit-Log-Auswertung über einen Konzentrationsbereich von 1,25 bis 320 AU erhalten. Für die 23 Tests nahm die Streuung der Standards vom niedrigen Konzentrationsbereich (4,7%) zu den hohen Konzentrationen (55%) deutlich zu.

Die Mittelwerte ($\bar{x}$), Streuungen (Standardabweichungen) und Variationskoeffizienten der wichtigsten Parameter der Logit-Log-Auswertung der 23 sauren Ferritin-RIAs unter Verwendung von Antiserum Nr. 60 C-fer alk/1 pH8 sind in Tabelle 4 zusammengestellt:

Die Bindungsaktivitäten der Null-Standards lagen im Mittel bei 30,6% und die Ferritinkonzentration für die 50%-Punkte bei 27,4 AU/ml (=109,6 ng/ml). Von den Kenngrößen der Logit-Log-Gleichungen lagen die A-Werte (= y-Achsenabschnitt) im Mittel bei 2,94 und die B-Werte (= Steigungen der Geraden) im Mittel bei -2,16 bei einer Streuung von 17,3 bzw. 12,3%. Der gemittelte B-Wert kommt dem nach theoretischen Berechnungen optimalen Steigungswert von -2,3 sehr nahe. (250a).

In Tabelle 5 sind die Werte der Intra-Assay-Variation aus 20 Bestimmungen von jeweils drei verschiedenen Kontrollseren dargestellt. Sie liegen beim sauren Ferritin-Assay zwischen

3,7 und 7,2% (allerdings bei ziemlich hohen Kontrollwerten im Vergleich zu gemessenen Serum Konzentrationen) und waren damit gut vergleichbar mit denen des Gesamtferritin-RIA mit Werten zwischen 5,6 und 7,1%.

Aus den Werten errechnet sich eine lineare Korrelation für die (nur) bei den Kontrollen mögliche Umwandlung von Ferritin-S (AU/ml) zu Ferritin-Ges (ng/ml) und umgekehrt von:

$$y \text{ (Ferritin-S)} = 0,52 \times (\text{Ferr-Ges}) + 24,2 \quad \text{und}$$

$$y \text{ (Ferr-Ges)} = 1,87 \times (\text{Ferr-S}) - 41,3$$

$$r = 0,983; \quad s_{y \cdot x} = 7,02; \quad N = 60; \quad p \quad 0,001 \text{ (gegen Null)}$$

Eine Inter-Assay-Variation konnte nicht berechnet werden, da aufgrund zweimaliger Veränderung der Kontrollseren (neue Verdünnungsreihen wegen zu hoher oder zu niedriger Konzentrationen) mit den endgültig verwendeten Kontrollseren keine genügend große Zahl von Bestimmungen für statistische Berechnungen mehr durchgeführt werden konnte.

In Abb. 56 ist eine SCATCHARD-PLOT-Untersuchung des für den Radioimmunoassay verwandten Antiserums Nr. 60 pH8 C-fer alk/1 wiedergegeben. Für diese Untersuchung wurden Standardpunkte der Standardgeraden von 3 RIAs (Nr. 12, 15, 17) einbezogen. Die aus 17 Punkten ermittelte Regressionsgleichung weist einen linearen Korrelationskoeffizienten von $r = -0,983$ und eine Streuung von $s_{y \cdot x} = 0,025$ auf. Die für das Antiserum ermittelte Affinitätskonstante ergab einen hohen apparenten Wert von $K_a = 8,75 \cdot 10^{10}$ l/Mol und eine apparente Konzentration von $C_a = 5,38 \cdot 10^{-12}$ l/Mol.

4. Haltbarkeit

Pro Markierung wurden ca. 100 bis 150 ml Tracer entsprechend 500-750 Doppelbestimmungen gewonnen und in 10ml-Portionen

bei 4°C gelagert. Das markierte Ferritin wurde in einer Zeit von 8 bis 12 Wochen verbraucht, wobei kein Hinweis auf eine wesentliche Verminderung der Immunreaktivität oder der Spezifität gefunden werden konnte. Die allmähliche Abnahme der Radioaktivität beeinflusste innerhalb dieser Frist die prozentuale Bindung, die Standardkurve und die Werte der Kontrollseren nicht signifikant.

TABELLE 3
FERRITIN-S - RADIOIMMUNOASSAY
BINDUNGS-AKTIVITÄTSWERTE (%) DER STANDARDS S1 BIS S8 (AU/ml) AUS
23 TESTEN

[illegible]

FERRITIN - S -RIA LOGIT - LOG - AUSWERTUNG VON 23 TESTS

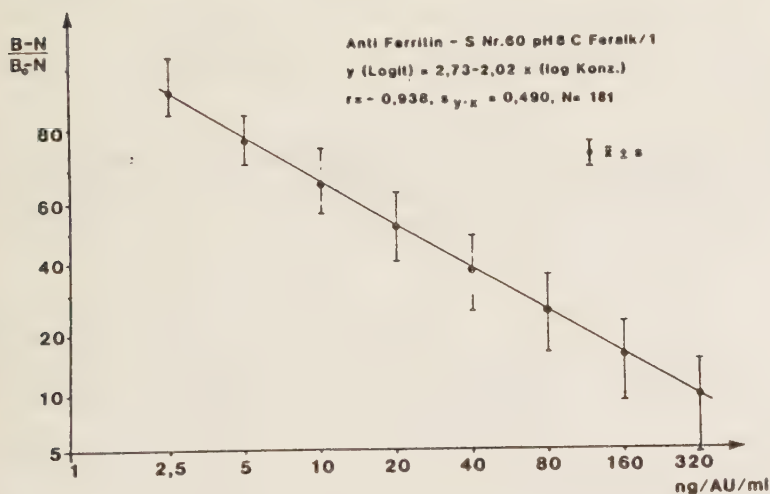


Abb. 55:

T A B E L L E 4

Mittelwerte, Streuungen und Variationskoeffizienten der wichtigsten Parameter der Logit-Log-Auswertung von 23 sauren Ferritin-Radioimmunoassay-Testen.

- Antikörper Nr. 60 C-fer alk/1 pH8, Verdünnung 1:2000,
- AK von der Ziege 1:20, Standards aus Fraktion HHF IEF I)

	BA%	50%-Punkt AU/ml	r	$s_{y \cdot x}$	A	B
N	23	23	23	23	23	23
$\bar{X}$	30,6	27,4	-0,998	0,092	2,94	-2,16
s	7,1	15,7	0,002	0,036	0,51	0,27
VK%	23,3	57,4	0,21	39,1	17,3	12,3

N=Anzahl, $\bar{x}$ = arithmetisches Mittel, s= Standardabweichung, VK%= Variationskoeffizient in%, BA= Bindungsaktivität des Nullwertes, r= lin. Korrelationskoeffizient, A= y-Achsenabschnitt, B= Steigung der Regressionsgeraden, AU= arbitrary units.

TABELLE 5

Intra-Assay-Variation von jeweils 2 verschiedenen Kontrollen aus 20 Bestimmungen. Kontrollen im sauren Test aus saurem Herzferritin HHF II, im Gesamtferritin-Test aus Lungenkarzinomferritin aus dem mittleren pH-Bereich.

TEST	K 1	K 2	K 3
Ferritin-S	$x=217,6 \pm 8,1$	$x=93,3 \pm 4,5$	$x=47,5 \pm 3,4$
Var.-Koeff. (N je 20)	3,7%	4,9%	7,1%
Ferritin-Ges.	$x=136,4 \pm 7,6$	$x=75,1 \pm 5,3$	$x=46,5 \pm 2,8$
Var.-Koeff. (N je 20)	5,6%	7,1%	6,0%
Verhältnis F-S/F-Ges.	1,59	1,24	1,02

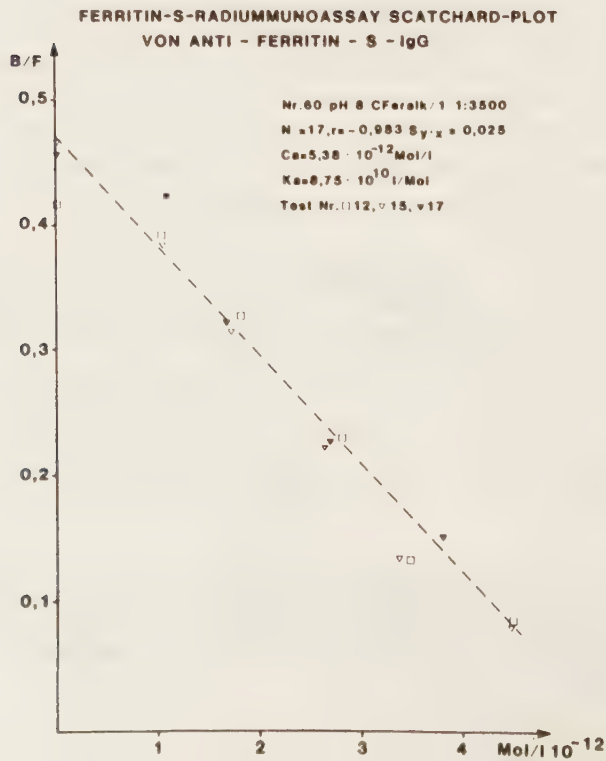


Abb. 56:

2.2.3.2. Serumbestimmungen bei Normalpersonen und Patienten

Die klinischen Ergebnisse sind in Tabelle 6-9 sowie in den Abbildungen 57 bis 61 zusammengestellt.

Saures Ferritin

1. Normalkollektiv

Die bei 104 gesunden jungen Männern im Alter von 20-45 Jahren im Serum gemessenen Ferritin-S-Spiegel lagen zwischen $< 1,25$ und maximal $4,4$ AU/ml mit einem 10. Perzentil (PZ) bei $1,1$ und einem 90. PZ bei $3,0$ und einem Median von $1,4$ AU/ml. Der Mittelwert betrug $1,8 \pm 0,8$ AU/ml (Variationskoeffizient $VK = 45,7\%$). Aufgrund der erhobenen Werte wurde eine obere Normgrenze von 5 AU/ml angesetzt. Variationskoeffizient und die Verteilung der Werte entsprechen keiner Normalverteilung, sondern einer linkssteilen Verteilung, da $58,7\%$ der Werte dem unteren Messgrenzwert von $< 1,25$ AU/ml entsprachen.

2. Benigne Erkrankungen

Die bei 19 Patienten mit Eisenmangelanämie gemessenen Ferritin-S-Konzentrationen im Serum lagen bis auf eine Ausnahme ($1,3$ AU/ml) auf dem unteren Meßgrenzwert von $< 1,25$ AU/ml und damit signifikant unter den Werten des Normalkollektivs ($p < 0,01$, Tab. 9).

Bei 20 Patienten mit Hepatitis zeigte sich bei einem Maximalwert von $5,3$ AU/ml ein Median von $1,6$ mit einem zentralen 80%-Bereich zwischen $1,1$ und $3,0$ AU/ml (Sensitivität = 5%). Ähnlich bis etwas niedriger lagen die Ferritin-S-Werte bei 33 Patienten mit Leberzirrhose entsprechend einem Median von $1,3$ und zentralen 80%-Bereich zwischen $1,1$ und $1,5$ AU/ml. Kein Wert lag dabei über 5 AU/ml.

3. Maligne Erkrankungen

Gegenüber einem Kollektiv von 28 Patienten mit AML (Median 1,3; 10./90. PZ 1,1-3,8 AU/ml, S=3,6%) zeigten 13 Patienten mit CML z.T. erheblich höhere pathologische Ferritin-S-Werte (Median 1,8; 10./90. PZ 1,2-5,1; S= 8,5%).

Vergleichbar niedrigere Medianwerte zwischen 1,3 und 1,6 AU/ml sowie 90. Perzentile zwischen 1,5 und 2,9 AU/ml wurden beim primären Leberzellkarzinom, Pankreas-, Magen-, Colon- und Ovarialkarzinom ermittelt. Höhere Ferritin-S-Werte fanden sich beim Bronchialkarzinom (Median 2,5; 10./90. PZ 0,5-5,3), Nierenkarzinom (Median 3,2; 10./90. PZ 1,1-6,6 AU/ml) und Mammakarzinom (Median 3,1; 10./90. PZ 0,7-5,9 AU/ml). Bei diesen drei Kollektiven lag auch die Rate erhöhter Werte > 5 AU/ml (Sensitivität) höher, nämlich zwischen 10,4 und 21,1%.

Ein statistischer Vergleich der verschiedenen meist linkssteilen Verteilungen im Kolmogoroff-Smirnoff-Test untereinander (Tab.9) ergab signifikant niedrigere Werte für die Anämie-Gruppe und signifikant höhere Werte vorwiegend für das Mammakarzinom-Kollektiv gegenüber den meisten anderen Kollektiven und dem Normalkollektiv.

Aus Tabelle 6 ist ersichtlich, daß die Spezifität des Ferritin-S-Tests gegenüber benignen Erkrankungen recht gut ist, die Sensitivitätsraten bei den Tumorgruppen jedoch maximal zwischen 10 und 20 und meist unter 10% liegen. Damit weist der Test für Tumorpatienten keinerlei diagnostische Bedeutung auf.

Gesamtferritin

1. Normalkollektiv

Die im gleichen Referenzkollektiv an 104 gesunden Probanden ermittelten Ferritin-Gesamt-Konzentrationen lagen im Mittel

bei $82,7 \pm 38,2$ ng/ml (VK= 46,2%) und wiesen einen Median von 75,8 sowie ein 10./90. PZ zwischen 40,7 und 141,4 ng/ml auf. Ihrer Verteilung nach handelt es sich um eine leicht linkssteile noch grob-normalverteilte Konzentrationsverteilung ($R/s = 4,6$). Anhand dieser Befunde wurde die obere Normgrenze bei 200 ng/ml festgelegt.

2. Benigne Erkrankungen

Wie aus Tabelle 7 ersichtlich, wiesen 19 Patienten mit Eisenmangelanämie Maximalwerte bis 18 ng/ml bei einem Mittelwert von $8,0 \pm 4,2$ ng/ml auf.

Demgegenüber zeigten 20 Patienten mit Hepatitis einen Median von 153,9 und einen zentralen 80%-Bereich zwischen 30,8 und 1100 ng/ml, was einer Sensitivität (>200 ng/ml) von 35% entsprach. Leicht niedriger lagen die Ferritin-Gesamt-Konzentrationen für 33 Patienten mit Leberzirrhose (Median 104,2; 10./90. PZ 20,6-256,7 ng/ml) und einem entsprechend niedrigeren Anteil erhöhter Werte von 15,2%.

3. Maligne Erkrankungen

Im Vergleich zu den Ferritin-S-Konzentrationen wies diesmal das Kollektiv mit AML höhere Werte mit einem Median von 270,0 und einem 10./90. PZ zwischen 52,5 und 397,5 ng/ml und eine hohe Sensitivität von 71,4% auf.

Niedriger lagen die Werte für das CML-Kollektiv mit einem Median von 175,0 bzw. einem 10./90. PZ von 115-340 ng/ml ($S=69,2\%$). Vergleichbar niedrigere Werte mit Medianen zwischen 70,5 und 94,1 ng/ml bzw. 90. PZ zwischen 127,5 und 355 ng/ml sowie Sensitivitätsraten zwischen 5,3 und 23,3% fanden sich für die Patientengruppen des primären Leberzellkarzinoms und Magen-, Colon- und Ovarialkarzinoms. Demgegenüber lagen höhere Medianwerte zwischen 120,8 und 218,2 ng/ml sowie ent-

sprechend höhere 90. Perzentile zwischen 227,5 und 620 ng/ml für die Patientengruppen mit Pankreas-, Bronchial-, Nieren- und Mammakarzinom vor. Nach den Leukämiegruppen wies die Mammakarzinomgruppe die höchste Sensitivität von 56,0% auf.

Ein statistischer Vergleich der verschiedenen Gruppenkonzentrationen ergab gegenüber dem Normalkollektiv signifikant niedrigere Werte für die Anämie-Gruppe ($p < 0,001$) sowie signifikant höhere Werte für die Leukämie-, Pankreas-, Bronchial- und Mammakarzinomgruppen ($p < 0,001$), während sich die anderen Gruppen nicht wesentlich bzw. nur grenzwertig vom Normalkollektiv und untereinander unterschieden.

Eine Korrelationsprüfung zwischen den in den verschiedenen Gruppen erhobenen Ferritin-S- und Gesamtferritin-Konzentrationen ergab für den überwiegenden Teil der Kollektive keine statistisch zu sichernde Rangkorrelation (Spearman) bis auf eine deutlich signifikante Korrelation zwischen den Werten bei der CML ($r_s = 0,754$, $p < 0,005$), dem Kollektiv mit Bronchialkarzinom ($r_s = 0,439$, $p < 0,005$) und grenzwertig für das Normalkollektiv ($r_s = 0,204$, $p < 0,05$).

Im Vergleich zur Ferritin-S-Bestimmung weisen Gesamtferritin-Bestimmungen zumindest für Patienten mit AML und CML sowie Patienten mit Mamma- und Bronchialkarzinom eine brauchbare Sensitivität zwischen 40 und 70% auf. Ihr Nachteil liegt jedoch in der mangelnden Spezifität gegenüber benignen Lebererkrankungen, entzündlichen Erkrankungen und Krankheiten mit Eisenüberladung.

CEA-Bestimmung

Zum Vergleich der Brauchbarkeit von Ferritin-S- und Gesamtferritin-Bestimmungen bei Tumorpatienten wurde CEA als einer

der wesentlichen Tumormarker mitbestimmt.

1. Normalkollektiv

Von den Voruntersuchungen des laboreigenen CEA-RIA wurde die Normgrenze von 3 ng/ml übernommen. Dieser Wert wurde an einem Kollektiv von 120 gesunden Probanden (Männer und Frauen im Alter zwischen 20 und 75 Jahren) erhoben, deren CEA-Serumwerte bis maximal 3,0 ng/ml lagen.

2. Benigne Erkrankungen

Wie aus Tabelle 8 hervorgeht, wiesen Fälle mit Hepatitis und Leberzirrhose vergleichbare CEA-Werte-Verteilungen mit einem Median von 2,1 und 10./90. PZ zwischen 1,2 und 5,9 bzw. 8,8 ng/ml bei Erhöhungen über die Normgrenze (> 3ng/ml) von rund 25% auf.

3. Maligne Erkrankungen

Ähnliche CEA-Werte mit Medianen zwischen 1,8 und 2,6 sowie stark schwankenden 90. Perzentilen zeigten sich für die Patientengruppen mit primärem Leberzellkarzinom, Pankreas-, Magen-, Bronchial-, Nieren- und Ovarialkarzinom mit Sensitivitätsraten zwischen 5,3 und 24,1% und herausragend deutlich höherer Sensitivität von 40,9% für das Pankreaskarzinom und 35,4% für das Bronchialkarzinom. Höchste und häufigste pathologische CEA-Werte fanden sich beim Colonkarzinom (Median 22,6; 10./90. PZ 3,1 - 430,6) und Mammakarzinom (Median 11,8; 10./90. PZ 3,7-248,6 ng/ml) mit entsprechend hohen Sensitivitätsraten von 90,0 bzw. 98,0%. Für diese beiden letzten Patientengruppen erwies sich trotz kleiner Kollektive die CEA-Bestimmung trotz einer verminderten Spezifität gegen benigne Lebererkrankungen wegen der hohen Sensitivität als gut brauchbar.

Wie aus Tabelle 9 zu entnehmen ist, zeigten sich signifikant deutlich pathologischere CEA-Werte für Patienten mit Colon- und Mammakarzinom gegenüber den anderen Gruppen (meist $p < 0,001$).

In den Abbildungen 57-61 sind die bei den untersuchten Kollektiven erhobenen Spiegelverteilungen für Ferritin-S, Ferritin-GES und CEA veranschaulicht. Bezüglich Ferritin-S (Abb. 57,58) liegt der überwiegende Teil der Befunde im Bereich < 2 AU/ml, während nur für die Kollektive mit CML, Mamma-, Nieren- und Bronchialkarzinom in einigen Fällen höhere Werte nachweisbar sind. Für Gesamtferritin (Abb. 59,60) sind die höheren Werte für AML und CML, das Mamma- und Bronchialkarzinom ersichtlich. Für CEA (Abb. 61) geht die deutlich höherwertige Verteilung für das Colon- und Mammakarzinom hervor.

TABELLE 6
FERRITIN-S (AU/ML) BEI PATIENTEN MIT BENIGNEM LEBER- UND
VERSCHIEDENEN MALIGNEN ERKRANKUNGEN (N=466)

PATIENTENGR.	N	10. PZ	MW	s	Med.	90. PZ	SENS.
Normalkoll.	104	1.1	1.8	0.8	1.4	3.0	0
Fe-Anämie	19		1.3	0.01			0
Hepatitis	20	1.1	1.7	1.2	1.6	3.0	5%
Leberzirrh.	33	1.1	1.3	0.3	1.3	1.5	0
AML	28	1.1	1.9	1.3	1.3	3.8	3.6%
CML	13	1.2	13.5	19.2	1.8	5.1	8.5%
PLC	29	1.1	1.4	0.6	1.3	1.6	0
Pankreas-Co	22	1.1	1.7	0.8	1.6	2.9	0
Magen-Co	32	1.1	1.4	0.3	1.3	1.5	0
Colon-Co	30	1.1	2.8	6.9	1.6	2.1	3.3%
Bronchial-Co	48	0.5	2.8	1.6	2.5	5.3	10.4%
Nieren-Co	19	1.1	2.7	2.6	3.2	6.6	21.1%
Ovarial-Co	19	1.1	1.6	1.3	1.5	2.0	5.3%
Mamma-Co	50	0.7	3.3	1.6	3.1	5.9	12.0%

Patientengr. = Patientengruppe; N = Anzahl; PZ = Perzentil; MW = arithmetisches Mittel;
s = Standardabweichung; Med. = Median; Sens. = Sensitivität > 5 AU/ml.

Tab. 6:

TABELLE 7
FERRITIN-GES (ng/ml) BEI PATIENTEN MIT BENIGNEM LEBER- UND
VERSCHIEDENEN MALIGNEN ERKRANKUNGEN (N=466)

PATIENTENGR.	N	10. PZ	MW	s	Med.	90. PZ	SENS.
Normalkoll.	104	40.7	82.7	38.2	75.8	141.4	0
Fe-Anämie	19		8.0	4.2			0
Hepatitis	20	30.8	374.3	482.5	153.9	1100.0	35.0%
Leberzirrh.	33	20.6	123.6	102.3	104.2	256.7	15.2%
AML	28	52.5	744.9	1020.2	270.0	397.5	71.4%
CML	13	115.0	1533	1497.3	175.0	340.0	69.2%
PLC	29	18.7	209.8	422.3	93.3	310.0	24.1%
Pankreas-Co	22	30.0	212.4	291.5	138.9	296.7	27.3%
Magen-Co	32	18.8	120.9	129.7	94.1	245.0	15.6%
Colon-Co	30	18.1	323.5	907.3	90.6	355.0	23.3%
Bronchial-Co	48	30.0	230.8	226.9	157.2	620.0	37.5%
Nieren-Co	19	31.7	130.6	89.3	120.8	227.5	15.8%
Ovarial-Co	19	19.0	77.3	58.4	70.5	127.5	5.3%
Mamma-Co	50	43.6	293.3	380.3	218.2	436.7	56.0%

Patientengr. = Patientengruppe; N = Anzahl; PZ = Perzentil; MW = arithmetisches Mittel;
s = Standardabweichung; Med. = Median; Sens. = Sensitivität > 200 ng/ml.

Tab. 7:

T A B E L L E
CEA (ng/ml) BEI PATIENTEN MIT BENIGNEN LEBER-
UND VERSCHIEDENEN MALIGNEN ERKRANKUNGEN (N=302)

PATIENTENGR.	N	10. PZ	Med.	90. PZ	SENS.
Hepatitis	20	1,2	2,1	5,9	25,0%
Leberzirrh.	33	1,2	2,1	8,8	24,2%
PLC	29	1,2	2,1	6,5	24,1%
Pankreas-Co	22	1,2	2,6	25,7	40,9%
Magen-Co	32	1,2	2,0	5,0	15,6%
Colon-Co	30	3,1	22,6	430,6	90,0%
Bronchial-Co	48	1,2	2,4	42,9	35,4%
Nieren-Co	19	1,2	1,8	2,9	5,3%
Ovarial-Co	19	1,2	2,0	92,5	15,8%
Mamma-Co	50	3,7	11,8	248,6	98,0%

Patientengr. = Patientengruppe, N = Anzahl, PZ = Perzentil; Med. = Median;
Sens = Sensitivität > 9 ng/ml

Tabelle 8:

FERRITIN-S-SPIEGEL IM SERUM BEI GESUNDEN UND PATIENTEN MIT VERSCHIEDENEN ERKRANKUNGEN (I)

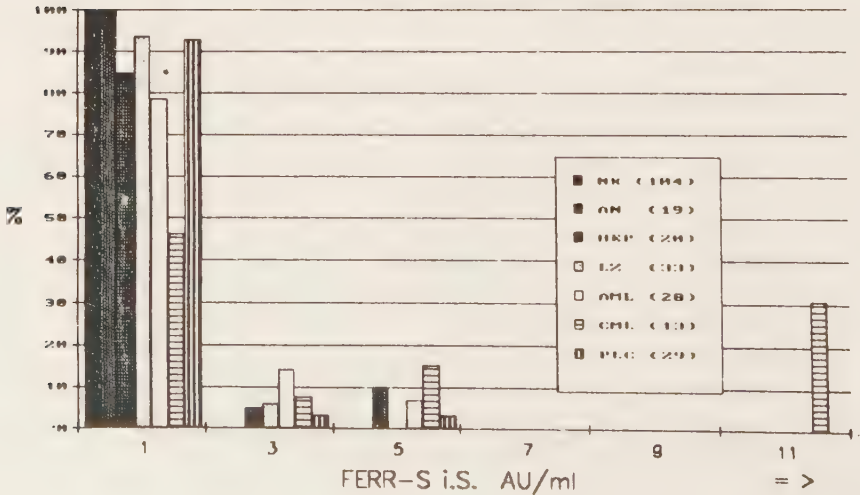


Abb. 57:

FERRITIN-S-SPIEGEL IM SERUM BEI PATIENTEN MIT VERSCHIEDENEN ERKRANKUNGEN (II)

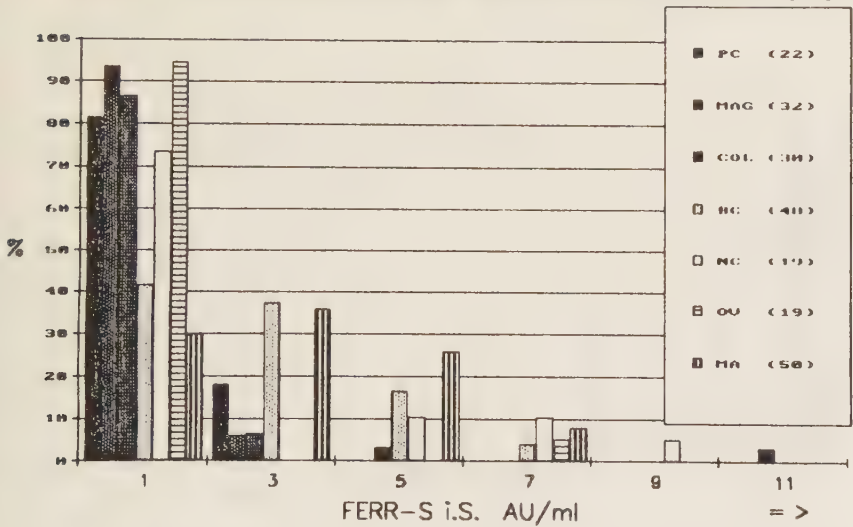


Abb. 58:

FERRITIN-GES-SPIEGEL IM SERUM BEI GESUNDEN UND PATIENTEN MIT VERSCHIEDENEN ERKRANKUNGEN (I)

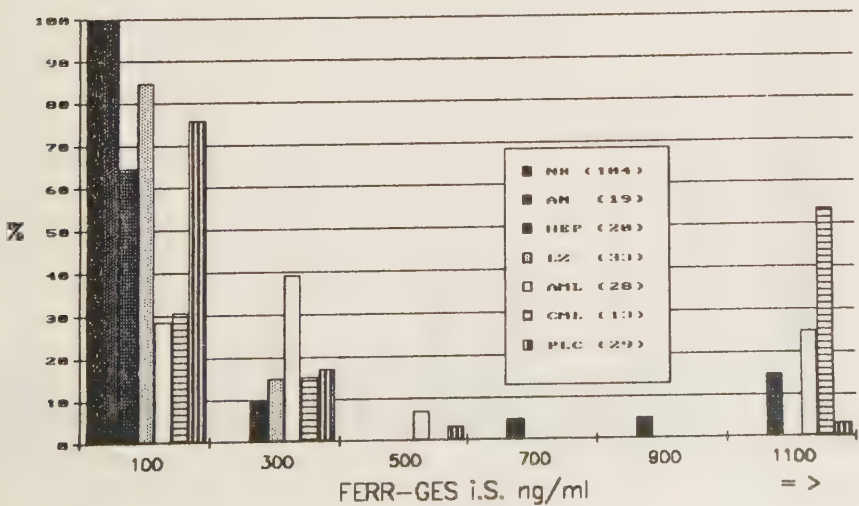


Abb. 59:

FERRITIN-GES-SPIEGEL IM SERUM BEI PATIENTEN MIT VERSCHIEDENEN ERKRANKUNGEN (II)

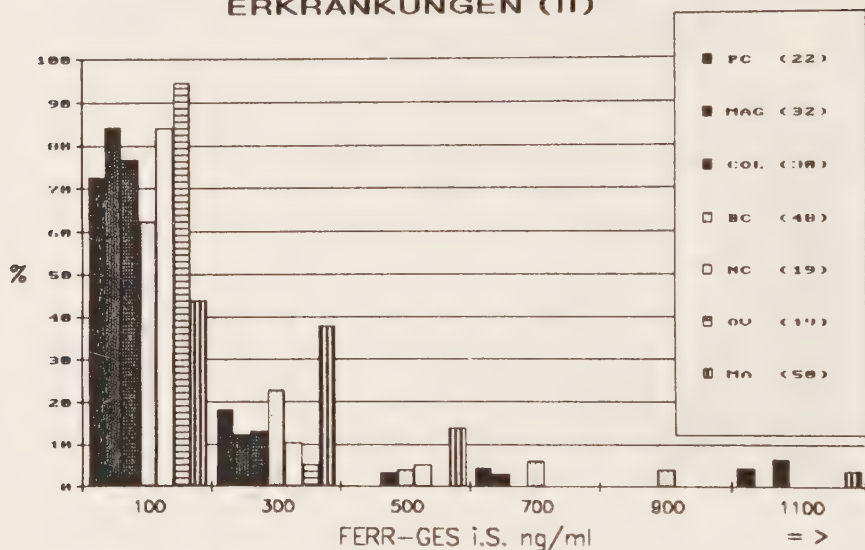


Abb. 60:

CEA-SPIEGEL IM SERUM BEI PATIENTEN MIT VERSCHIEDENEN MALIGNE ERKRANKUNGEN

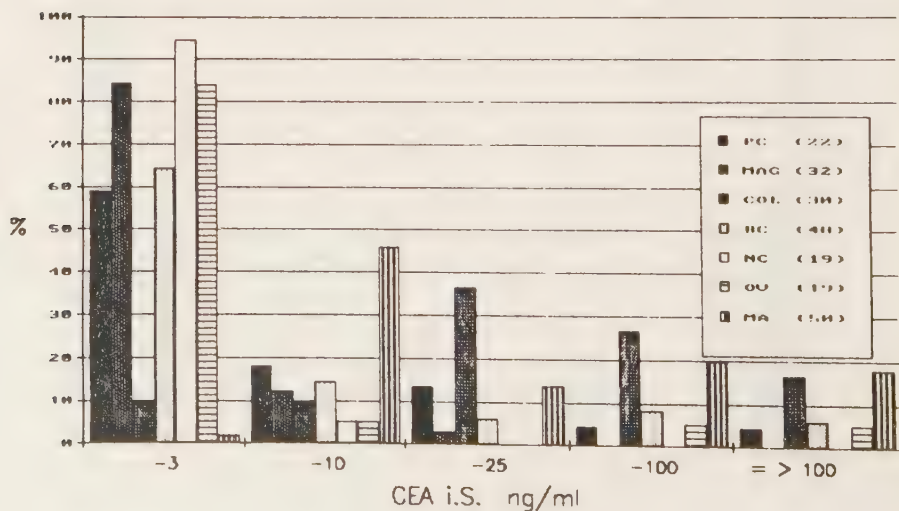


Abb. 61:

S I G N I F I K A N Z T A B E L L E
DER STATISTISCHEN PRÜFUNG VON CEA, FERRITIN-S UND FERRITIN-GES IM
SERUM BEI GESUNDEN UND PATIENTEN MIT BENIGNEN LEBER- UND
VERSCHIEDENEN MALIGNEN ERKRANKUNGEN (N=466)

GRUPPE	AN	HEP	LZ	AML	CML	PLC	PC	MAG	COL	BC	NC	OV	MA
cea													
fs	2	0	1	0	1	1	0	1	0	2	0	0	3
fg	3	1	1	3	3	0	3	0	0	3	2	0	3
cea													
fs	-	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	3
fg	-	0	2	3	3	2	3	1	2	3	3	3	3
cea		-	0			0	0	0	3	0	0	0	3
fs		-	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3
fg		-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
cea			-			0	0	0	3	0	0	0	3
fs			-	0	2	0	0	0	0	0	0	0	3
fg			-	3	2	0	0	0	0	0	0	0	2
cea													
fs				-	0	0	0	0	0	1	0	0	3
fg				-	0	2	1	3	2	1	2	3	0
cea													
fs					-	1	0	1	0	0	0	0	0
fg					-	1	1	2	1	0	1	3	0
cea						-	0	3	3	0	0	0	3
fs						-	0	3	0	3	0	0	3
fg						-	0	1	0	0	0	0	1
cea							-	0	3	0	0	0	3
fs							-	0	0	1	0	0	3
fg							-	0	0	0	0	2	0
cea								-	3	0	0	0	3
fs								-	0	3	0	0	3
fg								-	0	0	0	0	2
cea									-	3	3	3	0
fs									-	2	0	0	0
fg									-	0	0	0	1
cea										-	0	0	3
fs										-	0	3	0
fg										-	0	2	0
cea											-	0	3
fs											-	0	1
fg											-	1	1
cea												-	3
fs												-	3
fg												-	3

K=Normalkollektiv; AN=Fe-Anämie; HEP=Hepatitis; LZ=Leberzirrhose; AML=akute myeloische Leukämie; CML=chron. myeloische Leukämie; PLC=prim. Leberzellkarzinom; PC=Pankreaskarzinom; MAG=Magenkarzinom; COL=colorektales Karzinom; BC=Bronchialkarzinom; NC=Nierenkarzinom; OV=Ovarialkarzinom; MA=Mammakarzinom. fs=Ferritin-S; fg=Ferritin-GES. Signifikanzen: 0=nicht signifikant; 1=p<0,05; 2=p<0,01; 3=p<0,001.

Tabelle 9:

2.2.4. DISKUSSION

2.2.4.1. Methodischer Teil

Gewebeextraktion und Reinigung des Antigens

Die meisten Autoren gewannen alkalische Ferritine aus Leber- oder Milzgewebe und saure Ferritine aus Herzgewebe oder Hela-Zellkulturen.

Da es in einer vorangegangenen Arbeit unseres Labors nicht gelungen war, die sauren und alkalischen Isoferritine aus der Präparation eines einzigen Organes, nämlich reifen Plazenten (pI 4,8-5,5), immunologisch eindeutig voneinander zu unterscheiden, wurde in der vorliegenden Arbeit auf Herz (pI 4,7-5,6) und Leber (pI 5,2-5,6) als gesicherte Quelle für saure und alkalische Ferritine zurückgegriffen.

Im Gegensatz zum Verfahren der meisten Autoren (213, 160, 162, 111, 88, 182, 286) wurde bei den ersten drei Präparationen nach den Zerkleinern und Homogenisieren der Gewebe auf die Hitzefällung verzichtet, da diese nach Meinung anderer Untersucher das Risiko der Proteolyse und damit Veränderung der Immunogenität (172) oder der Anreicherung L-Ketten-reicher Ferritinfraktionen in sich birgt (276, 271, 220, 100). Eine Ultrazentrifugation, wodurch vor allem Ferritinmoleküle mit hohem Eisengehalt gewonnen werden sollen (286) (z.B. 78000 g für 1h, Lösung des Präzipitats, dann zweimalige Ultrazentrifugation bei 95000g für jeweils 1h (235)), wurde ebenfalls nicht durchgeführt, da ein hoher Eisengehalt von einigen Autoren vor allem den sauren (35, 271), von anderen mehr den alkalischen Ferritinen (60) zugeschrieben wird. Auch die Ammoniumsulfatfällung zur Ferritinanreicherung (160, 282, 195, 100) unterblieb zur möglichst schonenden Gewinnung des Proteins.

Eine weitere Möglichkeit der Ferritingewinnung aus dem Extrakt wäre die Kristallisation mit Kadmiumsulfat gewesen, wodurch Granick 1951 angeblich reines Ferritin gewonnen hat (111). Diese Methode schied ebenfalls aus, weil dadurch Herzferritin nicht kristallisierbar ist (17) und außerdem in der IEF Unterschiede zwischen CdSO_4 -kristallisiertem und nicht kristallisiertem Leberferritin gesehen worden waren (127).

Die zweite Leberpräparation schloß auch bei uns eine Hitze-fällung ein, da dabei ausschließlich die alkalischen Ferritine interessierten und ein Verlust an sauren Ferritinen nicht ins Gewicht gefallen wäre.

Der durch zweimalige Zentrifugation bei 9000 Upm für 2h aus dem Gewebehomogenat, welches nur mit NaCl-Lösung und dem Enzyminhibitor Trasylol versetzt worden war, gewonnene Extrakt wurde in Ultrafiltrationszellen über Membranen mit Überdruck eingeeengt. Anfangs wurde eine Membran mit Retention aller Moleküle über 12500 Daltons MG verwandt, die hohe Viskosität des Extraktes zwang jedoch bald zum Wechsel auf eine Membran mit einer höheren Ausschlußgrenze (MG 300 000), wodurch die Gefahr eines etwaigen Ferritinverlustes durch die Membran stieg. Bis auf gelegentliches Wechseln oder Reinigen der Membranen konnte die Konzentration der Extrakte ohne weitere Probleme in jeweils drei bis vier Tagen abgeschlossen werden. Eine weitere Druckfiltration der Lösungen durch Filter bis 0,6 oder 0,22 μm zur Entfernung möglichst vieler Schwebeteilchen gestaltete sich zwar überaus mühsam, erleichterte jedoch die anschließende Gelfiltration wesentlich.

Bei der weiteren Verarbeitung der Gewebsextrakte wurde zur Reindarstellung des Ferritins von den einzelnen Arbeitsgruppen meist eine Kombination der chromatographischen Methoden, die bereits ausführlich in 2.1.8. dargestellt wurden, angewandt. Dem Arbeitsgang der vorliegenden Arbeit kommt das Vor-

gehen von Lavoie et al. (173) nahe, bei dem sich an die Homogenisation und Zentrifugation von Plazentagewebe eine Immunaффinitäts-Chromatographie des Überstandes mit nachfolgender Endreinigung durch eine Sepharose-6B-Gelchromatographie anschloß. Nach Lamerz et al. (168) wurde der filtrierte und eingeeengte Überstand aus den zwei Zentrifugationen zuerst auf einer Sepharose-6B-Säule einer Gelchromatographie unterworfen und die ferritinreichen Fraktionen dann an einer CNBr-aktivierten Sepharose-4B-Immunaффinitätssäule weiterverarbeitet. Diese Reihenfolge erscheint deshalb zweckmäßiger, weil dadurch dem an die zweite Säule gekoppelten Antikörper das Ferritin bereits in höherer Konzentration angeboten wird. Die C33-Säule konnte pro Lauf maximal 3,2mg, die C48-Säule maximal 8mg Ferritin binden.

Sämtliche Ferritinfraktionen wurden bei 4°C gelagert, da in der Literatur über Strukturänderungen nach Einfrieren und Lyophilisation mit Rehydratation berichtet worden war (202).

Ferritinverluste durch die Gelchromatographie entstanden vor allem dadurch, daß einige noch ferritinhaltige Fraktionen aus der zweiten Hälfte der Trennung nicht weiterverarbeitet werden konnten, da sie durch ihre hohe Viskosität und Verunreinigung durch hochmolekulare Proteine und Schwebeteilchen die nachfolgenden Säulen verstopft hätten. Aus demselben Grund konnten auch die nichtbindenden Fraktionen C33/1 und C48/1 aus der Affinitätschromatographie mit bis zu 20mg/ml Ferritin-Restkonzentration höchstens einmal rechromatographiert werden, was einen weiteren Substanzverlust bedeutete. Außerdem gehen sämtliche Einengungen (Papiermembranen oder Kollodiumhülsen) mit Proteinverlusten an den Membranen einher. Bei steigender Ferritinkonzentration (ab etwa 4-5mg/ml) kam es zudem zur Ausfällung eines unlöslichen Niederschlages.

Zur quantitativen Auftrennung des Ferritinspektrums in Gruppen von Isoferritinen wurde entsprechend dem Vorgehen anderer Untersucher bei den ersten Präparationen die Anionenaustauschchromatographie angewandt (198, 286, 18, 162). Während Asakawa und Mori (18) die an DEAE absorbierten Ferritine diskontinuierlich mit Acetatpuffer pH 5,5-5,0-4,5 eluierten, wurden bei vorliegender Arbeit in Anlehnung an die von Konijn et al. (165) benutzte Methode mit einem kontinuierlichen NaCl-Gradienten (0- 0,45 molar) und somit steigender Ionenstärke des Puffers (0,05M Na-Phosphat pH 7,5) zuerst die alkalischen und dann die sauren Ferritinanteile eluiert. Trotz des hohen Auflösungsvermögens der verwandten HPLC-Säule Ultropac-2133-110 TSK DEAE 5PW war die Separation der willkürlich gewählten 3 bzw. 4 Isoferritingruppen auch nach mehrmaliger Rechromatographie unbefriedigend, da die Banden in der analytischen Isoelektrofokussierung noch stark überlappten. Die Ferritinausbeute nach diesem Schritt und der nachfolgenden Endreinigung der Einzelfractionen mittels hochauflösender Gelpermeations-Chromatographie HPLC Ultropac TSK-G 4000 SW zur Abtrennung der Ferritinpolymere war außerdem überraschend niedrig (zwischen 30 und 60%), was allerdings im Widerspruch zu in anderen Arbeiten gepriesenen vernachlässigbar geringen Substanzverlusten bei diesen Methoden steht. Gründe hierfür mögen die teilweise mehrfache Rechromatographie mit entsprechend wiederholten Einengungsvorgängen und auch Substanzverluste an Gefäßwände bei einer Verteilung relativ kleiner Fraktionen (0,5ml) auf viele einzelne Sammelgefäße bei der Fraktionskollektion sein.

Da die geringen Ferritinmengen aus den ersten beiden Präparationen (Herz: 650µg, Leber: 2,4mg) nur für die Immunisierung eines Hasen mit Gesamtherz-Ferritin bzw. die Herstellung einer Sepharose-4B-Säule mit angekoppeltem alkalischen Leberferritin ausreichten, wurde ein zweiter Organpool verarbeitet.

Bei dieser neuen Präparation wurde die Anionenaustauschchromatographie durch die präparative Isoelektrofokussierung ersetzt. Die Ausbeute schwankte dabei zwischen 36 und 66%. Die Vorteile dieser Methode waren die klare Auftrennung des Ferritins in einzelne Banden, welche bei guter Reproduzierbarkeit ziemlich genau den Banden in der analytischen Fokussierung entsprachen, und die Möglichkeit, bis zu 20mg Protein pro Lauf aufzutrennen. Die gewünschten Banden konnten mit einem Spatel scharf ausgestochen und problemlos vom Gel getrennt werden. Von Vorteil war dabei, daß die farbintensiven Ferritinbanden mit bloßem Auge gut abgrenzbar waren. Die Kontrolle der so gewonnenen Fraktionen mittels analytischer Fokussierung zeigte Ferritinbanden mit wenig Überlappungen, die beiden sauren Herzferritin-Fraktionen (HHF I und II) stellten sich sogar völlig überlappungsfrei dar, mit großem Abstand zur alkalischen Fraktion HHF IV.

Herstellung der Antiseren

Zur Herstellung von Antiseren gegen saure Ferritine wurden von manchen Autoren Meerschweinchen (35, 160) oder auch Schafe benutzt (200). Nach Marcus et al. (200) bilden Kaninchen nur Antikörper gegen die alkalischen Ferritinkomponenten, Jones und Worwood (156) berichteten jedoch über ein in Kaninchen hergestelltes Antiserum gegen saures Herzferritin. Aufgrund dieser Tatsache und wegen der im Vergleich zum Meerschweinchen größeren Ausbeute an Antiserum wurden für die vorliegende Arbeit Kaninchen als Antikörperlieferant gewählt (40, 198, 116, 103, 168).

Marcus und Zinberg (198) und Lamerz et al. (168) hatten zur Immunisierung ungereinigte Tumorextrakte benutzt. Wie die meisten anderen Autoren (160, 16, 116, 156, 103) immunisierten wir mit gereinigtem Ferritin. Die Immunisierungsmengen der verschiedenen Untersucher reichen von einigen μ g (16, 160)

bis zu einem oder mehreren mg (40, 116, 156, 168), welche bei der Erstimmunisierung meist mit komplettem Freund'schem Adjuvans i.c. (103), s.c. (160, 198, 168), i.m. (116, 156) oder i.v. (40) verabreicht wurden. Die Auffrischungsimpfungen erfolgten dann mit komplettem (156), inkomplettem (16, 160, 168) oder ohne Freund'sches Adjuvans (40, 74). Wir immunisierten in Anlehnung an die Methode von Hijmans et al. (131) mit 650 µg bzw. 1,0 mg Herzferritin in die Fußsohlen bzw. zur Boosterung in eine Ohrvene des Kaninchens. Dieses Schema lieferte in der verhältnismäßig kurzen Zeit von acht Wochen bei niedrigen Antigenmengen etwa 100ml hochtitriger Antiseren, wie der 50%-Punkt der IgG-Lösung Nr. 60 in der Antikörperverdünnungsreihe von 1:436 000 zeigt. Mittels einer Absorption mit lyophilisiertem Normalserum und Chromatographie über eine Protein-A-Säule wurde die reine IgG-Fraktion gewonnen. Eine Serumprobe des Kaninchens gegen Ende der Immunisierung zeigte durch eine Spornbildung im Ouchterlony-Test bereits an, daß mit dem Antiserum eine Unterscheidung zwischen alkalischem und saurem Ferritin möglich sein würde.

Immunad/-desorptionsstudien

Basierend auf der zur Zeit gültigen Theorie, wonach die sauren und alkalischen Eigenschaften der Organferritine vom Mischungsverhältnis ihrer Untereinheiten H und L im Molekül abhängig sind (38, 47, 292), und unter der Voraussetzung, daß diese Untereinheiten 45% Differenzen in der Primärstruktur (66) und unterschiedliche antigene Determinanten besitzen (195), muß es möglich sein, Antiseren herzustellen, welche die sauren und alkalischen Ferritine auch desselben Organs unterscheiden können.

Bereits Hazard et al. (127) und Jones (160) berichteten von Erfolgen, die Spezifität von Anti-Hela-Ferritin-Antiseren für

saure Ferritine durch Absorption mit Leber-Apoferritin bzw. Milzferritin zu steigern.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen der Versuch unternommen, durch Immunisierung mit Ferritinen vom sauersten Ende des Herzferritin-Spektrums mit einem pI von 4,7 bis 4,8 bereits eine spezifischere Bildung von Antikörpern gegen die sauren Ferritine bzw. die H-Ketten anzuregen. Zum anderen sollten durch eine Absorption an Säulen, an welche Isoferritine vom alkalischen Ende des Leberferritin-Spektrums (pI 5,5 bis 5,6) gekoppelt waren, solche Antikörper eliminiert werden, die noch gegen L-Ketten gerichtet waren.

Die Tatsache, daß Antiserum Nr. 59 nach Absorption an das alkalische Ferritin im Ouchterlony nicht zwischen saurem und alkalischem Ferritin unterscheiden konnte, macht deutlich, daß es zu diesem Zweck nicht ausreichend ist, mit dem Gesamtferritin eines als Quelle sauren Ferritins bekannten Organes zu immunisieren.

Eine mögliche Erklärung bieten die Arbeiten von Luzzago et al. (195) über die Struktur der Untereinheiten an: Da 14 von ihren 20 monoklonalen Ferritinantikörpern absolut spezifisch für eine Untereinheit waren, muß es Epitope auf beiden Ketten geben, die auf der anderen nicht vertreten sind. Sechs der Antikörper dieser Arbeitsgruppe reagierten mit beiden Untereinheiten, allerdings unterschiedlich stark. Daraus schloß man, daß identische Epitope entweder in verschiedener Dichte auf den Untereinheiten vorkommen, oder daß beide Ketten einige sehr ähnliche antigene Determinanten besitzen. Alle sechs Antikörper, die mit beiden Ketten reagierten, waren durch Immunisierung mit Herzferritin entstanden. Verantwortlich gemacht dafür wurde die größere Heterogenität des Herzferritins mit bis zu 30% L-Ketten, wodurch mehr Antikörper gegen diese ähnlichen Epitope induziert würden.

Dieser hohe Anteil alkalischen Ferritins im Gesamtherz-Ferri-

tin, dessen pI bis 5,6 reichte, kann eine Ursache dafür sein, daß es nicht gelang, aus dem Antikörper Nr. 59 durch die Affinitätschromatographie eine für saures Ferritin spezifische Fraktion abzuspalten. Die Konzentration des gebildeten spezifischen Antikörpers mag bei der geringen Menge des Immunogens dafür zu niedrig gewesen sein. Eventuell enthielt die alkalische Säule noch genug saures Ferritin, um auch viele spezifische anti-saure Ferritin-Antikörper mit zu absorbieren.

Mit dem zweiten Antiserum Nr. 60 konnte im Ouchterlony zwischen den beiden Ferritintypen differenziert werden. Diese Fähigkeit blieb auch in der an die alkalische Ferritin-Säule absorbierten Fraktion deutlich erhalten. Sie konnte sogar zwischen saurem und alkalischem H e r z-Ferritin unterscheiden, ein Beweis dafür, daß die Differenzierungsmöglichkeit nicht auf organotypischen Epitopen (Herz gegenüber Leber) beruht.

Die nicht -gebundene Fraktion C-fer alk/1 reagierte im Ouchterlony zwar nur noch mit dem sauren Ferritin, der Titer war jedoch sehr niedrig, so daß im RIA mit Verdünnungen von 1:2000 bis 1:5000 gearbeitet werden mußte. Trotz der Immunisierung mit dem sauersten Ferritin erkannte der überwiegende Anteil der gewonnenen Antikörper demnach das alkalische Ferritin an der Sepharose 4B-Säule. Dieses Ergebnis legt den Schluß nahe, daß die meisten antigenen Determinanten auf den Untereinheiten eine zumindest sehr ähnliche Struktur aufweisen, oder, daß die spezifischen sauren Epitope für die Bildung polyklonaler Antikörper schwächer immunogen sind.

Radioimmunoassay

1. Markierung und Reinigung des markierten Antigens

Die Mehrzahl der Autoren (160, 16, 103, 156, 84, 194, 210, 125) führte die Markierung des Ferritins nach der Chloramin T-Methode durch, wobei das Oxidationsmittel Chloramin T 125 Jodid in das reaktive Jod überführt, welches dann vorwiegend an die Tyrosingruppen des zu markierenden Proteins gebunden wird. Durch Zusatz des Reduktionsmittels Na-Disulfid wird diese Reaktion nach 25-60 Sekunden gestoppt. Die Reinigung des Gemisches zur Abtrennung von nicht gebundenem 125 Jod geschieht meist an einer Sephadex G75- und Sepharose 6B- (84), Sephadex G25- (16, 194, 199), nur einer Sepharose 6B-Säule (160, 103) oder einer Sephadex G50 fine- und anschließende Sepharose 6B-Säule (eigenes Labor). Die zweite Chromatographie ermöglicht, durch die Markierung geschädigtes Material zu entfernen. Der Nachteil der Chloramin T-Methode liegt in der Schädigung des Ferritins durch den direkten Kontakt mit dem Oxidationsmittel. Bolton et al. (34) hatten eine verminderte immunologische Aktivität und eine verminderte Stabilität bei auf diese Weise produzierten Ferritintracern gefunden.

Aus diesem Grund wurde ebenso wie bei einigen anderen Untersuchern (47, 195, 24) die schonendere Markierungsmethode nach Bolton-Hunter (32, 33) angewandt, bei der das Protein nicht direkt aggressiven Oxidantien ausgesetzt ist. In geringerer Modifikation der ursprünglichen Methode (32, 33, 47) wurde die Konjugationsreaktion nicht mit Glycin (1m Glycin 0,2 ml) gestoppt, sondern das Reaktionsgemisch direkt auf die Säule aufgetragen. Außerdem enthielt der Elutionspuffer bei dieser Chromatographie keine Gelatine (0,25%) als Trägerprotein für das markierte Protein (47). Die Nachteile dieses Verfahrens sind der höhere technische Aufwand durch die

zweistufige Reaktion und eine geringere Gesamtjodierungsausbeute als bei direkten Jodierungsverfahren. Durch Bezug fertigen Bolton-Hunter-Reagenzes konnte der erste Reaktionsschritt umgangen werden. Die erzielten vergleichsweise hohen spezifischen Aktivitäten (47, 195) zwischen 8 und $50 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ Protein sind erklärbar durch die Unabhängigkeit dieser Markierungsmethode von den beim Ferritin relativ spärlich vorkommenden Tyrosylresten (15). Die scharfe Auftrennung des Reaktionsgemisches ergab keinerlei Hinweise auf eine Degeneration des markierten Ferritins wie bei der Chloramit T-Methode.

2. Antikörperverdünnungskurven

Die maximalen Bindungen zwischen erstem Antikörper und markiertem Antigen betrugen bei Arosio (16) je nach Tracer zwischen 60 und 80%, bei Deppe et al. (84) 90 bis 93% und bei Hazard et al. (127) zwischen 90 und 95%.

Bei uns lagen die maximalen Bindungen der polyklonalen Antikörper im Ansatz mit Gesamt-Lungenkarzinomferritin zwischen 80 und 95%, im Ansatz mit dem alkalischen Tracer zwischen 50 und 95% und mit dem sauren Tracer zwischen 47 und 93%.

Die beiden Antikörper, die mit dem alkalischen Tracer weniger reagierten, waren die von der alkalischen Säule nicht absorbierten Anteile der Antikörper Nr. 59 (gegen Gesamtherzferritin) und Nr. 60 (gegen sauerste Herzferritin-Fraktion). Das bedeutet, daß die durch die Differentialabsorption besonders für saures Ferritin spezifisch erwarteten Antikörperanteile immer noch alkalisches Ferritin erkannten, wenn auch weniger stark, d.h. erst bei höheren Antikörperkonzentrationen. Diese letzte Aussage trifft besonders für AK Nr. 60 C-fer alk/1 pH8 zu. Auch die etwas flachere Bindungskurve dieser beiden Fraktionen deutet auf eine geringere Affinität zum alkalischen Tracer hin.

Die Affinitätschromatographie bewirkte damit zwar eine starke Anreicherung der für saures Ferritin spezifischen Antikörperanteile, sie konnte kreuzreagierende Fraktionen aber nicht 100%ig herausfiltern.

Vergleicht man die Untersuchungen mit den drei verschiedenen Tracern, so ergibt sich, daß der monoklonale 2A4-Antikörper allen anderen polyklonalen Antikörpern in der Spezifität für saures Ferritin deutlich überlegen ist, da er mit dem alkalischen und Gesamtferritin-Tracer in den verwandten Konzentrationen überhaupt nicht reagierte.

Vom Antikörper Nr. 60 wurden zwei Fraktionen untersucht: Der an die alkalische Säule gebundene Anteil C-fer alk/3, der im Ouchterlony mit beiden Ferritinen reagierte (jedoch eine Spornbildung zeigte), reagiert nach den 50%-Punkten (1: 405000 und 1:436200) mit dem sauren und alkalischen Tracer gleich gut. Damit ist er für einen RIA für saures Ferritin nicht geeignet.

Der nicht an die alkalische Säule gebundene Anteil C-fer alk/1 pH8, der im Ouchterlony-Test nur noch mit saurem Ferritin eine Reaktion zeigte, band zwar auch beide Tracer, den sauren jedoch ungleich stärker: Bei einer Verdünnung von 1:3200 ergaben sich mit dem sauren Tracer 50%, mit dem alkalischen unter 5% Bindung. Diese Antikörperfraktion wurde wegen dieser geringen Kreuzreaktivität in diesem Konzentrationsbereich in Verdünnungen von 1:2000 bis 1:5000 in dem neu aufgebauten RIA eingesetzt. Die Bindungen lagen dabei im erwünschten Bereich zwischen 30 und 50%. (Fraktion Nr. 60 C-fer alk/1 unterschied ebenfalls zwischen den Tracern, stand jedoch nicht in ausreichender Menge zur Verfügung).

Antikörper Nr. 49 (gegen alkalisches Plazentaferritin) zeigte eine gewisse Spezifität für alkalisches Ferritin, da die maximale Bindung mit dem sauren Tracer unter 50%, beim alkalischen jedoch bei 85% lag, und da die Bindungskurve mit dem sauren Tracer auch flacher verlief.

Überraschenderweise reagierte Antiserum Nr. 52, das gegen angeblich saures Lungenkarzinom-Ferritin hergestellt worden war, bevorzugt mit dem alkalischen Tracer (50%-Punkt 1:250000 gegenüber 1: 31190) und zeigte somit keinerlei Spezifität für saures Ferritin.

Antikörper Nr. 59 schließlich, der durch Immunisierung mit Gesamtherz-Ferritin entstanden war, zeigte auch im RIA nicht

die gewünschte Spezifität und reagierte sogar noch geringfügig stärker mit dem alkalischen Tracer (Verdünnung 1:3200 ergibt mit dem sauren Tracer 25%, mit dem alkalischen 30% Bindung).

Bei diesen Untersuchungen wurde somit deutlich, daß die Spezifität des polyklonalen Antiserums Nr. 60 durch Immunisierung mit nur dem sauersten Herzferritin-Anteil konzentrationsabhängig ist. Bei Verdünnungen unter 1:1600 nimmt die Bindung an den alkalischen Tracer deutlich zu.

Mit den verwendeten Methoden war es demnach nicht möglich, einen polyklonalen Antikörper zu produzieren, der für saures Ferritin ebenso spezifisch ist wie der monoklonale 2A4-Antikörper. Eine Population des - naturgemäß heterogenen Antikörpergemisches - wird noch durch zu viele verwandte Epitope auf den L-Ketten beeinflusst, wahrscheinlich auch aufgrund der oben erwähnten unbefriedigenden Ergebnisse der Affinitätschromatographie.

3. Standardinhibitionskurve und Testansatz

Für die Standardinhibitions-Untersuchungen wurden die polyklonalen Antikörperfraktionen Nr. 52 (überwiegende Reaktion mit dem alkalischen Ferritin), Nr. 60 C-fer alk/1 pH8 (spezifisch für saures Ferritin) und der monoklonale Antikörper 2A4 ausgewählt. Im Ansatz mit saurem, alkalischem und Gesamtferritin-Tracer wurde versucht, diese markierten Antigene durch verschiedene Standards zu verdrängen.

Dabei ergab sich im sauren Ansatz (saurer Tracer, AK Nr. 60) durch die sauren Standards eine lineare Logit-Log-Standardkurve in einem Bereich von 1,25 bis 320 AU/ml (=5-1280 ng/ml).

Die Meßbereiche anderer Ferritin-RIAs lagen bei Luxton et al. (194) zwischen 1,5 und 500, bei Deppe et al. (84) zwischen 2 und 500 und bei Guilleux (114) zwischen 10 und 600 ng/ml. Im IRMA konnten Konzentrationen bis 0,2 ng/ml (263), mit neueren ELISAs ebenfalls bis 0,2 ng/ml (140) bzw. sogar bis 2,3 pg/ml (138) gemessen werden.

Assays für saures Ferritin mit polyklonalen Antikörpern hatten Arbeitsbereiche von 1 bis 100 (16), 10 bis 200 (156) und 2 bis 1000 ng/ml (160). Der monoklonale IRMA der italienischen Arbeitsgruppe arbeitet zuverlässig von 1,5 bis 200 ng/ml (47). Damit ist die Sensitivität unseres Assays im unteren Bereich etwas geringer, die Meßfähigkeit nach oben besser als bei den meisten anderen Autoren.

Die Arbeitsverdünnung unserer IgG-Lösung war mit 1:2000 bis 1:5000 relativ gering. Dies lag daran, daß durch die Differentialabsorption an alkalisches Ferritin ca. 95% der Antikörper von Antiserum Nr. 60 herausabsorbiert worden waren. Mit dieser Verdünnung wurde eine Bindungsaktivität von 30-50% erreicht, was sich mit dem von Hazard et al. angestrebten Bereich deckt (127), jedoch deutlich unterhalb der Bindung von z.B. 65% bei Deppe et al. (84) liegt. Die unspezifische Bindung war mit kleiner 5% vernachlässigbar gering.

Auch der alkalische Standard verdrängt im sauren Ansatz, allerdings erst ab Konzentrationen über 2000 ng/ml. Die Spezifität unseres Assays für saures Ferritin ist damit besser als die der Tests von Arosiò et al. (16) 1981, von Hazard et al. und Jones et al. von 1977 (125, 156), da Leberferritin in jenen Assays schon ab 100 ng/ml deutlich inhibierte. Sie liegt auch noch über der verbesserten Spezifität des Assays von Jones und Mitarbeitern von 1980 (160), bei dem eine Verdrängung ab 250 ng/ml alkalischen Ferritins auftrat. Eine deutlich höhere Spezifität im Vergleich zu unserem RIA weist

der monoklonale IRMA von Cavanna et al. (47) auf, Leberferritin verdrängt dort bis 10 000 ng/ml nicht.

Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, als der monoklonale Antikörper, selbst wenn er gegen ein ausschließlich auf der sauren Kette vorkommendes Epitop gerichtet ist, zumindest mit den H-Ketten des alkalischen Ferritins reagieren müßte, die nach dem allgemein anerkannten Strukturmodell auch dort zu mindestens 10% vorkommen.

Die Theorie von Cavanna et al. (47) einer Konformationsänderung des Moleküls bei zunehmendem L-Ketten-Anteil, so daß dieses Epitop bei sehr alkalischen Ferritinen auf den H-Ketten nicht mehr an der Oberfläche exponiert ist, wäre eine einleuchtende Erklärung.

Der monoklonale Antikörper könnte außerdem organspezifisch für Herzferritin sein, ausgelöst durch ein "herztypisches", von H- oder L-Ketten unabhängiges, Epitop der Herzferritine, da die von der italienischen Gruppe getesteten nicht-inhibierenden alkalischen Ferritine alle aus Leber oder Milz hergestellt waren. Unsere Ergebnisse aus der Testung von alkalischem Herzferritin, welches den sauren Tracer schlechter als saures Herzferritin verdrängte, sprechen allerdings eher gegen diesen Gedanken.

Daß bei einer anderen Art von Immunoassay, dem "Immunodotting" (verschiedene Ferritinmengen werden auf Nitrozellulosepapier mit dem radioaktiven Antikörper inkubiert) (195), der 2A4-Antikörper mit Leberferritin ab 1000 ng eine Reaktion zeigte, d.h. weniger spezifisch für das saure Ferritin war, läßt eine andere Erklärung wahrscheinlich werden:

Der für die saure Untereinheit wahrscheinlich absolut spezifische monoklonale Antikörper reagiert auch mit den H-Ketten des alkalischen Ferritins, die geringe Zahl von H-Ketten bei alkalischen Ferritinmolekülen reicht jedoch bei kompetitiven oder "sandwich"-Assays für ein positives Ergebnis nicht aus, d.h. die Spezifität des AK wird durch diese Testart erhöht.

Die alkalische Herzferritin-Fraktion verdrängt im sauren Assay besser als Leberferritin, jedoch weit schlechter als die saure Herzferritin-Fraktion. Der Unterschied zur Leberferritinfraktion wird aus den Ergebnissen der analytischen Fokussierung verständlich: Die alkalische Herzferritin-Fraktion reicht weiter in den sauren Bereich hinein, hat also noch mehr H-Ketten, als die alkalischste Leberfraktion.

Im Ansatz mit dem Gesamtferritin-Tracer und mit dem alkalischen Tracer verdrängen die sauren Standards zwar auch, aber die geringere Steigung der Standardgeraden und die höheren Konzentrationen bei den 50%-Punkten weisen auf eine gegenüber alkalischem und kommerziellem Standard geringere Inhibitionsfähigkeit hin. Erst etwa 10 000 ng/ml saures Ferritin ergeben im Gesamtferritin-RIA die gleiche Verdrängung wie 200 ng/ml B&D-Standard, d.h. der im Labor etablierte Ferritin-RIA ist zur Messung sauren Ferritins in Patientenseren ungeeignet.

Auffällig an der sauren Standardgeraden im Test mit dem sauren Tracer und dem monoklonalen Antikörper ist der geknickte Verlauf der Geraden, wobei die Inhibition erst bei ca. 40 ng/ml saures Ferritin beginnt. Eine mögliche Ursache wäre die relativ niedrigere Affinitätskonstante des monoklonalen Antikörpers von $K_a = 10^{10}$ l/mol (eigener AK: $K_a = 8,75 \times 10^{10}$) gegenüber saurem Ferritin (48). Ebenso wie der Arbeitsgruppe von Cavanna (48) gelang es auch hier nicht, mit dem monoklonalen Antikörper einen sensitiven RIA für saures Ferritin zu erstellen: Die sauren Standards verdrängten schlecht (s.o.) und die Normalseren ergaben aufgrund unbekannter unspezifischer Bindungsvorgänge zu hohe Werte. Es ist auch allgemein bekannt, daß sich monoklonale Antikörper weniger gut für kompetitive Tests eignen und aufgrund der gleichförmigen Bindung an nur ein Epitop zu einer verminderten Stabilität des dreidimensionalen Raumnetzes führen.

Zusammenfassend ergibt sich, daß unser polyklonaler RIA für saure Ferritine bei ausreichender Sensitivität die geringste

Kreuzreaktivität mit alkalischem Ferritin von den bisher beschriebenen polyklonalen Assays aufweist. Dies beweist auch die später ermittelte Überwiegend völlig fehlende, bzw. nur grenzwertige Korrelation zwischen Ferritin-S und Gesamtferritin (Tabelle 9). Wie man aus dem Vergleich von 23 Standardkurven sieht, besitzt unser Test auch eine gute Reproduzierbarkeit. Die Handhabung ist einfach, wenig stör-anfällig, und der Verbrauch an markiertem Antigen und an Antikörper gering.

2.2.4.2. Bestimmung von saurem Ferritin, Gesamtferritin und CEA bei Normalpersonen und Patienten

Saures Ferritin

1. Normalwerte

Nach Jones et al. (156) lagen die Normalwerte für saures Ferritin im Serum unter 10 ng/ml, in den Untersuchungen von 1980 sogar unter 3,5 ng/ml (160). Arosio et al. (16) legten den Normbereich auf 11-44 ng/ml fest, Niitsu und Mitarbeiter fanden sogar einen Mittelwert von 135 ng/ml (220). Mit dem monoklonalen IRMA ermittelten Cavanna et al. 1984 bei Normalpersonen saure Ferritinspiegel zwischen < 2 und 39 ng/ml, Cazzola ein Jahr später zwischen < 1,5 und 16 ng/ml (48, 55). Der von uns gemessene Maximalwert von 4,4 AU/ml (= 17,6 ng/ml) im Serum von 104 gesunden Personen ist somit am ehesten vereinbar mit den Werten des monoklonalen Assays, er liegt jedoch deutlich über den Ergebnissen von Jones (160).

2. Nichtmaligne Erkrankungen

Bei den untersuchten nichtmalignen Erkrankungen Hepatitis und Leberzirrhose konnten von uns bis auf eine Ausnahme von 5,3 AU/ml bei einem Patienten mit Hepatitis keine Werte oberhalb der oberen Normgrenze von 5 AU/ml (= 20 ng/ml) erhoben werden. Sie liegen damit weit unter den von Niitsu et al. (220) und Hazard und Drysdale (126) gefundenen Maximalwerten für Pankreatitis (740 ng/ml) und Hepatitis (1000 ng/ml), sind jedoch gut vergleichbar mit den mit dem monoklonalen Test ermittelten Werten für nichtmaligne Lebererkrankungen (maximal 14 ng/ml bei einem Referenzbereich bis 16 ng/ml (55)). Die von Cavanna et al. (48) und Cazzola (55) gefundenen erhöhten Ferritin-S-Werte von bis zu 54 bzw. bis zu 84 ng/ml bei Eisenmangelanämie konnten wir jedoch nicht bestätigen. Sie lagen bei uns signifikant niedriger als die Normalwerte.

3. Maligne Erkrankungen

Die bei malignen lymphatischen Erkrankungen mit den früheren Tests erhobenen ziemlich hohen Ferritin-S-Werte (ALL: 148 ng/ml, AML: 135 ng/ml, = Mittelwerte bei Normbereich bis 100 ng/ml (126); akute Leukämien: Mittelwert = 79 ng/ml bei Normalwert < 10 ng/ml (156); M. Hodgkin: Maximalwert bis 1000 ng/ml bei Referenzbereich bis 41 ng/ml (50) wurden in den folgenden Jahren durch die Entwicklung spezifischerer Tests meist nach unten korrigiert. Die jetzt angegebenen Maximalspiegel für AML von 41 ng/ml (normal bis 3,5 ng/ml), für ALL bis 14,5 ng/ml (normal bis 3,5 ng/ml) (160) und M. Hodgkin bis 40 ng/ml (normal bis 16 ng/ml) (55) liegen jedoch noch immer gering über den Normalwerten.

Die Serumspiegel für saures Ferritin bei den AML-Patienten lagen bei uns alle im Normbereich, während bei der CML ein-

zelne höhere Werte bis 47 AU/ml (=188 ng/ml) gemessen wurden. Als Ursache dafür kommt vor allem eine Kreuzreaktion mit dem in diesen Seren ebenfalls stark erhöhten alkalischen Ferritin (alle > 3500 ng/ml) in Frage. Diese Beziehung ist auch aus der deutlich positiven Korrelation zwischen Ferritin-S und Ferritin-GES ($r_s = 0,754$, $p < 0,005$) bei dieser Erkrankung ersichtlich. Über einen Zusammenhang zwischen den (wenigen) erhöhten Ferritin-S-Spiegeln und den extrem erhöhten Milztyp-Ferritinwerten berichteten auch Jones und Mitarbeiter (160). Bei den monoklonalen Assays wird eine solche Beziehung verneint.

Für die erhöhten Ferritin-S-Werte bei lymphatischen Erkrankungen könnten die von Dörner et al. (86) gefundenen hohen Spiegel dieses Isoferritins in T-Lymphozyten und in T-lymphoblastischen Lymphomen (268) oder eine erhöhte Zahl ferritintragender T-Lymphozyten (152, 166) von Bedeutung sein. Die hohen sauren Ferritinspiegel bei M. Hodgkin könnten, obwohl keine Zunahme derartiger Isoferritine in den kranken Lymphozyten gefunden wurde (268), allein von einer großen Tumormasse herrühren, da in Lymphozyten an sich schon die sauren Isoferritine überwiegen (159).

Die Ferritin-S-Maximalwerte bei den anderen malignen Erkrankungen lagen bei uns meist im Normbereich von 20 ng/ml (primäres Leberzellkarzinom, Magen- und Pankreaskarzinom), bei einigen etwas darüber, bis 7 AU/ml (=28 ng/ml) (Ovarial-, Bronchial- und Mammakarzinom) und bei zweien bis 9 bzw. bis 15 AU/ml (=36 bzw. 60 ng/ml) (Nierenzell- und Colonkarzinom). Ein Signifikanzniveau von mindestens $p < 0,01$ erreichten nur das Mamma- und das Bronchialkarzinom bei allerdings sehr geringen Sensitivitäten von 12 und 10,4%.

Diese Befunde stimmen gut mit den Ergebnissen von Jones et al. (156, 160) (Normalwerte für Pankreaskarzinom, Werte für

Magen- und Bronchialkarzinom geringfügig darüber) überein. Die Werte für Mammakarzinom (maximal 53ng/ml im fortgeschrittenen Stadium) und primäres Leberzellkarzinom (maximal 28 ng/ml) lagen bei ihnen allerdings etwas höher. Vergleichswerte für Ovarial- oder Nierenzellkarzinom sind bei diesen Untersuchern nicht vorhanden, auch liegen keine Ergebnisse über maligne Erkrankungen (außer M. Hodgkin) bei Testung mit dem monoklonalen Antikörper vor.

Damit konnten, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Jones (156, 160), Cazzola (55) und Cavanna et al. (48), die früheren Befunde von Niitsu (220), Hazard (126), Arosio (16), Cazzola (50) und Powell (233) über die teilweise extrem erhöhten Serumwerte für saures Ferritin sowohl bei M. Hodgkin und beim primären Leberzellkarzinom, als auch bei allen anderen malignen Erkrankungen nicht bestätigt werden.

Da unser Test für saures Ferritin auch bei den Tumoren mit erhöhten Spiegeln nur eine sehr geringe Sensitivität (maximal 21,1%) erreichte, hat er für Tumorpatienten keinerlei diagnostische Bedeutung. Auch Jones et al. (160) kamen, trotz der Zunahme der Sensitivität auf 79 bzw. 49% bei fortgeschrittenen Erkrankungsstadien (AML, Mammakarzinom), in Anbetracht der wesentlich stärkeren Anstiege beim alkalischen Ferritin zu diesem Ergebnis.

Als Ursache für die niedrigen Ferritin-Spiegel sind die neu entdeckten und inzwischen gut charakterisierten Serum-Bindungsfaktoren für saures Ferritin interessant (24, 55, 68, 73). Neue Perspektiven für saure Ferritine, die offenbar nicht mit dem Eisenhaushalt des Menschen korrelieren (55, 253), eröffnen die seit neuem diskutierte Rolle der sauren Ferritine in der Pathogenese von Leukämien (41) oder die Hemmung des Immunsystems durch zellständige saure Isoferritine (119, 166, 208). Diese neuen Ergebnisse sind allerdings nicht unumstritten (151a).

Gesamtferritin

1. Normalwerte

Die von uns festgelegte obere Normgrenze für das Gesamtferritin bei 104 gesunden Männern von 200 ng/ml ist gut vergleichbar mit den Normbereichen anderer Autoren von 18-251 ng/ml (50), 5-225 ng/ml (160), 11-200 ng/ml (16), bis 193 ng/ml (199; nur Männer) oder 45-175 ng/ml (114). Die obere Normgrenze einiger anderer Untersucher lag hingegen etwas höher bei 306 bzw. 330 ng/ml (55, 194).

2. Ferritin-GES in Patientenserien

Weitgehende Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Untersucher ergab sich bei unseren Gruppen von AML und CML (155, 169, 204, 160, 234), die bei uns die höchsten Sensitivitäten erreichten (71,4 bzw. 69,2%). Bei Hazard (126) lagen die Mittelwerte deutlich höher, bei Pagé (228) etwas niedriger.

Beim Pankreas- und Bronchialkarzinom ermittelten wir deutlich geringere Sensitivitäten (27,3 bzw. 37,5%) als die meisten anderen Untersucher (8, 69, 113, 168, 174, 220, 221), sie waren jedoch gut vergleichbar mit den Ergebnissen von Jones (160) und Akahonai et al. (8).

Die Sensitivität von 56% beim Mammakarzinom bei uns stimmte in etwa mit den Befunden von Marcus et al. (199) (41%) überein. Andere Gruppen hatten hingegen weit niedrigere Werte ermittelt (147, 160, 206).

In weitgehender Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Zavagno und Ishitani (174, 298) war bei unseren Kollektiven von Magen-, Colon- und Nierenkarzinom der Prozentsatz pathologischer Ferritinwerte gering (maximal 23,3%).

Die größten Differenzen ergaben sich beim primären Leberzellkarzinom (S= 24%), bei dem andere Untersucher über Sensitivi-

vitäten zwischen 56,8 und 100% berichteten (8, 162, 174, 265).

Auch wenn sich gegenüber dem Normalkollektiv für die Leukämie-, Pankreas-, Bronchial- und Mammakarzinomgruppe signifikant höhere Werte mit Sensitivitäten zwischen 27,3 und 71,4% ergaben, und einige Untersucher auch eine Abhängigkeit der Spiegel vom Tumorstadium gefunden hatten (69, 199, 206), schränkt die geringe Spezifität des Tests ($S_{\text{Hepatitis}} = 35\%$!) seine Anwendbarkeit für Tumorpatienten stark ein. Außerdem ist das Gesamtferritin stark von Geschlecht, Alter und Eisenhaushalt des Patienten abhängig.

CEA

Zum Vergleich der Brauchbarkeit von Ferritinen als Tumormarker wurde bei den meisten Kollektiven der Wert für das CEA mitbestimmt. Die hohen Sensitivitätsraten beim Mamma- (98%) und Colonkarzinom (90,0%) unterstreichen, trotz einer verminderten Spezifität des Tests gegenüber z.B. benignen Lebererkrankungen und relativ kleinen Patientenzahlen, die überragende Bedeutung dieses Antigens als Tumormarker bei diesen malignen Erkrankungen, wo er vor allem zur Verlaufsbeobachtung eingesetzt wird.

3. Z U S A M M E N F A S S U N G

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wird eine ausführliche Übersicht über physikochemische Eigenschaften, Metabolismus, Aufgaben, Vorkommen, Präparation und Messung der menschlichen Ferritine gegeben. Dabei wird in besonderer Weise auf die Entwicklung der Erkenntnisse über physiologische Funktion und klinische Bedeutung der sauren Ferritine bei benignen und malignen Erkrankungen eingegangen.

Im folgenden Teil wird ein schonendes Extraktionsverfahren von gepoolten Herz- und Lebergeweben als Ausgangsmaterial für die Ferritin-Präparation beschrieben. Aus den durch mechanische Zerkleinerung (Virtis Homogenisator; Potter), Zentrifugation (9000 Upm, 120', 4°C) und anschließende Konzentration ohne Hitzefällung (mit Ausnahme der 2. Leberpräparation) gewonnenen Rohextrakten wurde das Gesamtferritin mittels Gelfiltration, Affinitäts-Chromatographie (Immunsorption mit an Sepharose-4B immobilisierten selbst hergestellten Anti-Ferritin-Antikörpern) und hochauflösender HPLC-Gelpermeationschromatographie isoliert.

Die weitere Auftrennung von Herz- und Leberferritin in die entsprechenden sauren und alkalischen Isoferritine geschah anfangs durch DEAE-HPLC-Anionenaustauschchromatographie und später, wegen unbefriedigender Ergebnisse mit dieser Methode, durch präparative Isoelektrofokussierung in granulierten mit Ampholyten versetzten Flachbettgelen. Die Qualität der einzelnen Präparations-Schritte wurde durch analytische Untersuchungen (Dünnschicht-Polyacrylamid- und Agarose-Gelelektrophorese und Isoelektrofokussierung, Immundiffusion, radioimmunologische quantitative Bestimmung) überwacht.

Mit hochgereinigtem Gesamt-Herzferritin und dem sauersten Isoferritin-Anteil vom Herzferritin (HHF I,II) wurden daraufhin zwei Kaninchen für die Antiserumherstellung immunisiert und die IgG-Gesamtfraktion der erhaltenen hochtitrigen polyklonalen Antiseren (Nr. 59 und 60) nach Absorption mit lyophilisiertem Normalserum durch Affinitätschromatographie an Protein-A-Sepharose-4B gewonnen.

Die hochgereinigten alkalischsten Leberferritin-Fraktionen (HLF IV) wurden zur Herstellung von Immunabsorptions-Säulen verwandt. Die beiden Antikörper wurden, nach wiederholter Differentialabsorption an diese Immunsäulen, durch Immundiffusion und radioimmunologische Untersuchungen auf ihre Spezifität für saures Ferritin geprüft.

Dabei zeigte nur Antikörper Nr. 60, der durch Immunisierung mit der sauersten Isoferritin-Fraktion von Herzferritin entstanden war, eine hohe Spezifität für saures Ferritin bei einer Kreuzreaktivität gegenüber alkalischem Isoferritin von < 5%. Die Immunisierung mit Gesamt-Herzferritin war demnach zur Herstellung eines für saures Ferritin spezifischen polyklonalen Antikörpers nicht ausreichend.

Mit dem spezifischen Anti-Ferritin-S-Antikörper Nr. 60 wurde ein kompetitiver Doppelantikörper-Radioimmunoassay entwickelt, wobei die eigenen sauersten und alkalischsten Isoferritine als Standards und nach Radiojodmarkierung mit ^{125}J (Bolton-Hunter-Methode) als Tracer dienten. Über einen weiten Meßbereich von 5 bis 1280 ng/ml wurden damit reproduzierbare, lineare Standardgeraden erzielt (Logit-Log-Auswertung).

Vergleichende Untersuchungen mit einem H-Ketten-spezifischen monoklonalen Herzferritin-Antikörper (2A4) einer italienischen Arbeitsgruppe (Arosio et al.), die eine ebenso hohe Bindung wie mit dem eigenen polyklonalen Antikörper an saures Herzferritin sowie ebenfalls eine fehlende Bindung an den al-

kalischen Leberferritin-Tracer ergaben, sind ein weiterer Beweis für die hohe Spezifität des entwickelten Ferritin-S-RIA.

Diese Spezifität lag bei einer Beeinflußbarkeit durch alkalisches Ferritin erst ab 2000 ng/ml über der Spezifität aller bisher beschriebenen polyklonalen Assays für saures Ferritin.

Mit diesem RIA wurden in einem Kollektiv von 104 männlichen Probanden maximale Serumspiegel von 17,6 ng/ml gemessen und dementsprechend eine obere Normgrenze von 20 ng/ml (5 AU/ml) festgelegt. Bei 362 Patienten mit benignen und malignen Erkrankungen wurden in den meisten Fällen ebenfalls Werte im Normalbereich ermittelt. Vereinzelt erhöhte Spiegel bei malignen Erkrankungen (bis maximal 188 ng/ml bei CML) ergaben, bei einer guten Spezifität gegenüber nichtmalignen Erkrankungen, nur geringe Sensitivitätsraten von maximal 12% (Mammakarzinom) bzw. 21,1% (Nierenkarzinom). Ein Signifikanzniveau von $p < 0,001$ gegenüber dem Normalkollektiv erreichte nur das Mammakarzinom.

Mit dem Gesamtferritin-RIA konnten in den gleichen Patientenkollektiven sehr viel häufiger pathologische Ferritinwerte erhoben werden (AML: 71,4%; CML: 69,2%; Mammakarzinom: 56,0%, Bronchialkarzinom: 37,5%; Pankreaskarzinom: 27,3%), welche sich jeweils auch signifikant vom Normalkollektiv ($p < 0,001$) unterschieden. Die Spezifität des Tests gegenüber benignen Erkrankungen (Hepatitis, Leberzirrhose) war allerdings gering.

Die hohe Sensitivität der CEA-Bestimmung bei den gleichen Kollektiven, v.a. beim Mamma- und Colonkarzinom (90 bzw. 98%), unterstreicht die Bedeutung dieses Antigens als Tumormarker.

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit werden die erhaltenen Ergebnisse mit den Befunden anderer Untersuchungsgruppen verglichen und kritisch analysiert. Aus den eigenen Untersuchungen wird, übereinstimmend mit den neueren Befunden anderer Gruppen mit hochspezifischen polyklonalen bzw. monoklonalen Assays für saures Ferritin, aufgrund der geringen Sensitivi-

ität gefolgert, daß der Bestimmung von saurem Isoferritin im Serum von Tumorpatienten keinerlei diagnostische Bedeutung zukommt. Dieses Ergebnis steht in deutlichem Widerspruch zu früheren Publikationen, die dem sauren Isoferritin im Serum eine größere Bedeutung als dem Gesamt- oder alkalischen Ferritin eingeräumt hatten.

Auch das Gesamtferritin erscheint wegen seiner geringen Spezifität für maligne Erkrankungen gegenüber benignen Erkrankungen (v. a. Entzündungen) als Tumormarker nicht geeignet.

4. L I T E R A T U R V E R Z E I C H - N I S

1. ADDISON, G.M., BEAMISH, M.R., HALES, C.N.:
An immunoradiometric assay for ferritin in the serum
of normal subjects and patients with iron deficiency
and iron overload.
J. Clin. Pathol. 25: 326 (1972)
2. ADDISON, J.M., FITTON, J.E. LEWIS, W.G., MAY, K., HARRI-
SON, P.M.:
The amino acid sequence of human liver apoferritin.
Febs letters 164 (1): 139-144 (1983)
3. ADDISON, J.M., TREFFRY, A., HARRISON, P.M.:
The location of antigenic sites on ferritin molecule.
Febs letters 175: 333-336 (1984)
4. ADELMANN, T.G., AROSIO, P., DRYSDALE, J.W.:
Multiple subunits in human ferritins: Evidence for hy-
brid molecules.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 63: 1056-1062 (1975)
5. ADELMANN, T.G., DRYSDALE, J.W.:
Synthesis of ferritin subunits by free and membrane
bound ribosomes.
In: BROWN, E.B., FIELDING, J., CRICHTON, R.R. (Hrsg.),
Proteins of iron metabolism, Grune & Stratton, New York,
S.: 49 (1977)
6. AKAHONAI, Y., TAKAHASHI, A., YACHI, A., WADA, T.:
Elektrofokussing analysis of isoferitins.
In: FISHMAN, W.H., SELL, S. (Hrsg.), Onco-Developmental
Gene Expression, Acad. Press, N.Y., S.Franc., London:
763 (1976)
7. ANAOKAS, S., GARRY, P.J., STAUDEFER, J.C.:
Solid-Phase Enzyme Immunoassay for serum ferritin.
Clin. Chem. 25: 1426 (1979)
8. AKAHONAI, Y., YACHI, A., WADA, T.:
Isoferitins: clinical application.
In: LEHMANN, F.G. (Hrsg.), Carcino-Embryonic Proteins,
Vol. II, Elsevier/North-Holland, Biomed. Press, S. 441
(1979).
9. ALPERT, E., COSTON, R.L, DRYSDALE, J.W:
Carcino-foetal human liver ferritins.
Nature 242: 194-196 (1973)

10. ALPERT, E:
Characterization and subunit analysis of ferritin isolated from normal and malignant human liver.
Cnacer Res. 35: 1505-1509 (1975)
11. ALPERT, E., SNYDER, D.S., DAVENPORT, L., QUARONI, A:
Human liver ferritin : Alterations in primary structure and antigenicity in a malignant liver cell line.
In: Lehmann, F.G.)Hrsg.), Carcino-Embryonic Proteins, Vol. I, Elsevier/North- Holland Biomed. Press, S. 261 (1979)
12. AL-SHAWI, A., DAWONAY, A., LANDON, J:
A novel immunoradiometric assay for human liver ferritin.
J. Clin. Pathol. 36: 440-444 (1983)
13. AROSIO, P., YOKOTA, M., DRYSDALE, J.W:
Structural and immunological relationship of isoferritins in normal and malignant cells.
Cancer Res. 36: 1735-1739 (1976)
14. AROSIO, P., YOKOTA, M., DRYSDALE, J.W:
Characterization of serum ferritin in iron overload: possible identity to natural apoferritin.
Br. J. Haematol. 36: 199-207 (1977)
15. AROSIO, P., ADELMANN, T.G., DRYSDALE, J.W:
On ferritin heterogeneity. Further evidence for heteropolymers.
J. Biol. Chem. 253: 4451-4458 (1978)
16. AROSIO, P., IACOBELLO, C., MONTESORO, E., ALBERTINI, A:
Serum ferritin evaluation with radioimmunoassays specific for HeLa- and liver ferritin Types.
Immunology letters 3: 309-313 (1981)
17. AROSIO, P., GATTI, G., BOLOGNESI, M:
Selective crystallisation of horse isoferritins.
Biochim. Biophys. Acta 744 (2): 230-232 (1983)
18. ASAKAWA, H., MORI, W:
Possible unique subunit(s) of human ferritins responsible for tissue specificity.
Hoppe-Seyler's Ztschr. für Physiol. Chemie 364 (7): 859 (1983)
19. AZIZ, N., MUNRO, H.N:
Both subunits of rat liver ferritin are regulated at a translational level by iron induction.
Nucleic Acids Research 14: 915-927 (1986)
20. BASSETT, M.L., HALLIDAY, J.W., POWELL, L.W:
Ferritin synthesis in peripheral blood monocytes in idiopathic hemochromatosis.
J. Lab. Clin. Med.: 137-145 (1982)

21. BAYNES, R., BEZWODA, W., BOTHWELL, T., KHAN, Q., MASSOVER, N.:
The nonimmune inflammatory response: serial changes in plasma iron, iron-binding capacity, lactoferrin, ferritin and C-reactive protein.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 46: 695-704 (1986)
22. BEAUMONT, C., SIMON, M., FAUCHET, R., HESPEL, J.P., BRISSOT, P., GENETET, B., BOUREL, M.:
Serum ferritin as a possible non-invasive marker of the hemochromatosis gene.
N. Engl. J. Med. 301: 169-174 (1979)
23. BEAUMONT, C., SIMON, M., SMITH, P.M., WORWOOD, M.:
Hepatic and serum ferritin concentrations in patients with idiopathic hemochromatosis.
Gastroenterol. 79: 877-883 (1980)
24. BELLOTTI, V., AROSIO, P., CAZZOLA, M., COZZI, A., LEVI, S., MELONI, F., ZAPPONE, E:
Characteristics of a ferritin-binding protein present in human serum.
Br. J. Haematol. 65: 489-493 (1987)
25. BEZWODA, W.R., BOTHWELL, T.H., TORRANCE, J.D., MAC PHAIL, A.P., CHARLTON, R.W., KAY, G., LEVIN, J:
The relationship between marrow iron stores, plasma ferritin concentrations and iron absorption.
Scand. J. Haematol. 22: 113 (1979)
26. BEZWODA, W.R., DERMANN, D.P., BOTHWELL, T.H., BAYNES, R., HESDORFFER, C., MAC PHAIL, A.P:
Serum ferritin and Hodgkin's disease.
Scand. J. Haematol. 35: 505-510 (1985)
27. BIEBER, C.P., BIEBER, M.M:
Detection of ferritin as a circulating tumor associated antigen in Hodgkin's disease.
J. Natl. Cancer Inst. Monogr. 36: 147-157 (1973)
28. BIRGEGARD, G., HÄLLGREN, R., VENGE, P., WIDE, L:
Serum ferritin during inflammation. A study on myocardial infarction.
Acta Med. Scand. 206: 361-366 (1979)
29. BIRGEGARD, G:
The source of serum ferritin during infection. Studies with concanavalin-A-Sepharose absorption.
Clin. Sci. 59: 385-387 (1980)
30. BOLARIN, D.M:
Serum ferritin in Nigerian patients with Burkitt's lymphoma and other malignant diseases.
Acta Trop. 40:71 (1983)

31. BOLOGNESI, M., GATTI, G., LEVI, S., GABRI, E., AROSIO, P:
Crystallographic data for horse heart ferritin.
Febs letters 165 (1): 63 (1984)
32. BOLTON, A.E., HUNTER, W.M:
A new method for labelling proteins/ hormones with radioiodine for use in the Radioimmunoassay.
J. Endocrinol. 55: 300 (1972)
33. BOLTON, A.E., HUNTER, W.M:
The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ^{125}J -containing acylating agent. Application to the radioimmunoassay.
Biochem. J. 133: 529 (1979)
34. BOLTON, A.E., LEE-OWN, N., KRAMER McLEAN, R., CHALLAND, G.S:
Three different radioiodination methods for human spleen ferritin compared.
Clin. Chem. 25: 1826 (1979)
35. BOMFORD, A., BERGER, M., LIS, Y., WILLIAMS, R:
Biochemical and Biophysical Research Communications, 83: 334-341 (1978)
36. BOTTKE, W., CRICHTON, R.R.;
Comp. Biochem. Physiolog. 77B, 57-61 (1984)
37. BOYD, D., JAIN, S.K., CRAMPTON, J., BARRETT, K., DRYSDALE, J.W:
Isolation and characterization of a cDNA clone for human ferritin heavy chain.
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81:4751-4755 (1984)
38. BOYD, D., VECOLI, C., BELDER, D.M., JAIN, S.K., DRYSDALE, J.W:
Structural and functional relationship of human ferritin H- and L-chains deduced from cDNA clones.
J. Biol. Chem. 260: 11755-11761 (1985)
39. BRYCE, C.F., CHRICHTON, R.R:
The subunit structure of horse spleen ferritin.
J. Biol. Chem. 246: 4198 (1971)
40. BULLOCK, S., BOMFORD, A., WILLIAMS, R:
A biochemical comparison of normal human liver and hepatocellular carcinoma ferritins.
Biochem. J. 185: 639-645 (1980)
41. BROXMEYER, H.E., GENTILE, P., LISTOWSKY, I., CAVANNA, F., FEICKERT, H.J., DÖRNER, M.H., RUGGERI, G., CAZZOLA, M., COOPER, S:
Acidic iso-ferritins in the regulation of haematopoiesis in vitro and in vivo.
In: Ferritins and iso-ferritins as biochemical markers, Albertini, A., Arosio, P., Chiancone, E., Drysdale, J. (Hrsg.), Elsevier science publishers, Amsterdam, New York, Oxford, S. 97-111 (1984)

42. CAIRO, G., BARDELLA, L., SCHIAFFONATI, L., AROSIO, P., LEVI, S., BERNELLIN-ZAZZERA, A:
Multiple mechanisms of iron-induced ferritin synthesis in HeLa-cells.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 133/1: 314-321 (1985)
43. CAIRO, G., VEZZONI, P., BARDELLA, L., SCHIAFFONATI, L., RAPPOCCIOLO, E., LEVI, S., AROSIO, P., BERNELLI-ZAZZERA, A:
Regulation of ferritin synthesis in malignant and non-malignant lymphoid cells.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 139/2: 652-657 (1986)
44. CASEY, G., RUOTZKI, Z., KIMBER, R.J:
Reduction of the high dose hook effect in the serum ferritin assay.
Br. J. Haematol. 43: 675-677 (1979)
45. CASCEY, J.H., JONES, C., MILLER, Y.E., SELIGMAN, P.A:
Human ferritin gene is assigned to chromosome 19.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80: 482-486 (1983)
46. CARTWRIGHT, G.E., DEISS, A:
Sideroblasts, siderocytes and sideroblastic anemia.
N. Eng. J. Med. 292: 185 (1975)
47. CAVANNA, F., RUGGERI, G., IACOBELLO, C., CHIEREGATTI, G., MARADOR, E., ALBERTINI, A., AROSIO, P:
Development of a monoclonal antibody against human heart ferritin and its application in an immunoradiometric assay.
Clin. Chim. Acta 134(3): 347-356 (1983)
48. CAVANNA, F., RUGGERI, G., CHIEREGATTI, G., MURADOR, E., AROSIO, P., ALBERTINI, A:
Evaluation of heart isoferritins in serum using specific monoclonal antibodies.
La Ricerca, Clin. Lab. 14: 337 (1984)
49. CAZZOLA, M., BERGAMASCHI, G., DEZZA, L., BAROSI, G., ASCARI, E:
The origin of serum ferritin in acquired transfusional iron overload in adults. Studies with concanavalin A-Sepharose absorption.
Haematologica 67: 817 (1982)
50. CAZZOLA, M., AROSIO, P., GOBBI, P.G., BAROSI, G., BERGAMASCHI, G., DEZZA, L., IACOBELLO, C., ASCARI, E:
Basic and acidic isoferritins in the serum of patients with Hodgkins disease.
Europ. J. Cancer Clin. Oncol. 19(3): 339-345 (1983)
51. CAZZOLA, M., AROSIO, P., BAROSI, G., BERGAMASCHI, G., DEZZA, L., ASCARI, E:
Ferritin in the red cells of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload.
Brit. J. Haemat. 53: 659-665 (1983)

52. CAZZOLA, M., BORGNA-PIGNATTI, C., de STEFANO, P., BERGAMASCHI, G., BONGO, I.G., DEZZA, L., AVATO, F:
Internal distribution of excess iron and sources of serum ferritin in patients with Thalassaemia.
Scand. J. Haematol. 30: 289 (1983)
53. CAZZOLA, M., DEZZA, L., BERGAMASCHI, G., BAROSI, G., BELLOTTI, V., CALDERA, D., CIRIELLO, M.M., QUAGLINI, S., AROSIO, P., ASCARI, E:
Biologic and clinical significance of red cell ferritin.
Blood 62(5): 1078-1087 (1983)
54. CAZZOLA, M., BAROSI, G., BELLOTTI, V., BERGAMASCHI, G., CALDERA, P., CIRIELLO, M.M., DEZZA, L., ASCARI, E:
Biologic and clinical significance of isoferritins in red blood cells.
In: Albertini, A., Arosio, P., Chiancone, E., Drysdale, J. (Hrsg.): Ferritins and isoferritins as biochemical markers, Elsevier science publishers, Amsterdam, New York, Oxford, S.197-206 (1984)
55. CAZZOLA, M., AROSIO, P., BELLOTTI, V., BERGAMASCHI, G., DEZZA, L., IACOBELLO, C., RUGGERI, G:
Use of a monoclonal antibody against human heart ferritin for evaluating acidic ferritin concentration in human serum.
Br. J. Haematol. 61: 445-453 (1985)
56. CAZZOLA, M., ASCARI, E:
Red cell ferritin as a diagnostic tool.
Br. J. Haematol. 55: 73-81 (1983)
57. CHANN, B.E., ROESER, P., NIKLES, A.C., RIDGWAY, K.M:
Lipid associated tissue ferritin.
Clin. Chim. Acta 158: 71.79 (1986)
58. CHAPMAN, R.W., GORMAN, A., LAULICHT, M., HUSSAIN, M.A., SHERLOCK, S., HOFFBRAND, A.V:
Binding of serum ferritin to concanavalin-A in patients with iron overload and with chronic liver disease.
J. Clin. Pathol. 35: 481-486 (1982)
59. CHAPMAN, R.W.G., HUSSAIN, M.A.M., GORMAN, A., LAULICHT, M., POLITIS, D.I.M.A., FLYNN, D.M., SHERLOCK, S., HOFFBRAND, A.V:
Effect of ascorbic acid deficiency on serum ferritin concentration in patients with β -thalassaemia major and iron overload.
J. Clin. Pathol. 35: 487-491 (1982)
60. CHIANCONE, E., STEFANINI, S:
Heterogeneity of ferritin. I, Structural and functional aspects.
In: Albertini, A., Arosio, P., Chiancone, E., Drysdale, J. (Hrsg.): Ferritins and isoferritins as biochemical markers, Elsevier science publishers, Amsterdam, New York, Oxford, S. 23-31 (1984)

61. CHOU, P.Y., FASMAN, G.D.;
Adv. Emzymol. Relat. Areas,
Mol. Biol. 47: 45-148 (1978)
62. CHOU, C., GATTI, R.A., FULLER, M.L., CONCANNON, P.,
WONG, A., CHADA, S., DAVIS, R.C., SALSER, W.A.,
Mol. Cell. Biol. 6: 566-573 (1986)
63. COLLAWN, J.F., DONATO, H.J., COUNCIL, E., FISH, W.W:
Separation of multiple subunit types by reversed-
phase HPLC.
Journal of Liquid Chromatographie 9 (8): 1679-1688 (1986)
64. CONSTANZO, F., SANTORO, C., COLEMTUONI, V., BENSI, G.,
RANGEI, G., ROMANO, V., CORTESE, R:
Cloning and sequencing of a full length cDNA coding for
a human apoferritin H-chain: Evidence for a multigene
family.
EMBO-J. 3:23-27 (1984)
65. CONSTANZO, F., SANTORO, C., CORTESE, R:
The structure of human apoferritin genes.
In: Ferritins and isoferritins as biochemical markers,
Albertini, A., Arosio, P., Chiancone, E., Drysdale, J.
(Hrsg.), Elsevier science publishers, Amsterdam, New York,
Oxford, S. 79-85 (1984)
66. CONSTANZO, F., SANTORO, C., CORTESE, R:
Structure of human Apoferritin gene-family.
Communication "RIA '84", Ferritin and Isoferritins as
biochemical markers, Milan (Italy) 4:79-85 (1984)
67. COVELL, A.M., WORWOOD, M:
Isoferritins in plasma.
In: Ferritins and isoferritins as biochemical markers,
Albertini, A., Arosio, P., Chiancone, E., Drysdale, J.
(Hrsg.), Elsevier science publishers, Amsterdam, New York,
Oxford, S.49-65 (1984)
68. COVELL, A.M., JACOBS, A., WORWOOD, M:
Interaction of ferritin with serum: implication for
ferritin turnover.
Clin. Chim. Acta 139: 75-84 (1984)
69. COX, R., GYDE, O.H., LEYLAND, M.J:
Serum ferritin levels in small-cell lung cancer.
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 22(7): 831-835 (1986)
70. CRAGG, S.J., JACOBS, A., PARRY, D.M., WAGSTAFF, M.,
WORWOOD, M:
Isoferritins in acute leukaemia.
Brit. J. Cancer 35: 635-643 (1977)

71. GRAGG, S.J., WAGSTAFF, M., WORWOOD, M:
Sialic acid and the microheterogeneity of human serum ferritin.
Clinical Science 58: 259-262 (1980)
72. CRAGG, S.J., WAGSTAFF, M., WORWOOD, M:
Detection of a glycosylated subunit in human serum ferritin.
Biochem. J. 199: 565-571 (1981)
73. CRAGG, S.J., COVELL, A.M., BURCH, A., OWEN, G.M., JACOBS, A., WORWOOD, M:
Turnover of ^{51}Cr -human spleen ferritin in plasma.
Brit. J. Haematol. 55(1): 83-92 (1983)
74. CRAGG, S.J., HOY, T.G., JACOBS, A:
The expression of cell surface ferritin by peripheral blood lymphocytes and monocytes.
Brit. J. Haematol. 57: 679-684 (1984)
75. CRAGG, S.J., DRYSDALE, J., WORWOOD, M:
Genes for the "H" subunit of human ferritin are present on a number of human chromosomes.
Hum. Genet. 71: 108-112 (1985)
76. CRICHTON, R.R., MILLAR, J., CUMMING, R.C.L., BRYCE, C.F.A:
The organ specificity of ferritin in human and horse liver and spleen.
Biochem. J. 131: 51-59 (1973)
77. CRICHTON, R.R., BRYCE, C.F.A:
The organ specificity of ferritin in human and horse liver and spleen.
Biochem. J. 131: 51-59 (1973)
78. CRICHTON, R.R., ROMAN, F., WAUTERS, M:
Reductive mobilization of ferritin iron by reduced nicotinamid-adenin dinucleotide flavin mononucleotide.
Biochem. Soc. Trans. 3: 946-948 (1975)
79. CRICHTON, R.R., WAUTERS, M., ROMAN, F:
Ferritin iron uptake and release.
In: Proteins of iron storage and transport in Biochemistry and Medicine, Crichton, R.R. (Hrsg.), Amsterdam, North Holland: 287-294 (1975)
80. CRICHTON, R.R., FUNK, F., LESUISSE, E:
Intracellular iron metabolism revisited.
In: Protides and Biological Fluids, Peeters, E. (Hrsg.), Brüssel 31: 159-163 (1983)
81. CRICHTON, R.R:
In: Structure and function of iron storage and transport proteins, Urushizaki, I., Aisen, P., Listowsky, L., Drysdale, J.W. (Hrsg.), Elsevier, North-Holland, Biomedical Press, New York, S. 85-92 (1983)

82. CYNKIN, M. A., KNARLTON, M:
Studies on the carbohydrate components of ferritin.
In: Proteins of Iron Metabolism, edited by Brown, E.B.,
Aisen, P., Fielding, J., Crichton, R.R.; New York:
Grune&Stratton, S. 115-120 (1977)
83. DAMOUR, O., DELLAMONICA, C., VERNET, M., COLLOMBEL, C.,
LASNE, Y:
Ferritines et Isoferritines tissulaires et circulantes.
Path. Biol. 34/2: 131-143 (1986)
84. DEPPE, W.M., JOUBERT, S.M., NAIDOO, P:
Radioimmunoassay of serum ferritin.
J. Clin. Pathol. 31: 872 (1978)
85. DIAMANDIS, E.P., EFSTATHIOU, G.E., HADJIIOANNOU, T.P:
Serum ferritin determination by enzyme immunoassay. Im-
portance of sample dilution (the "Hook effect").
Clin. Chem. 28(1): 253-254 (1982)
86. DÖRNER, M.H., SILVERSTONE, A., NISHIYA, K., DE SOSTOA, A.,
MUMM, G., DE SOUZA, M:
Ferritin synthesis by human T-lymphocytes.
Science 209: 1019-1021 (1980)
87. DÖRNER, M.H., ABEL, U., FRITZE, D., MANKE, H.G., DRINGS, P:
Serum ferritin in relation to the course of Hodgkin's
disease.
Cancer 52: 2308-2312 (1983)
88. DRYSDALE, J.W., MUNRO, H.N:
Small-scale isolation of ferritin for the assay of the
incorporation of ¹⁴C-labelled amino acids.
Biochem. J. 95: 851-858 (1965)
89. DRYSDALE, J.W:
Microheterogeneity of ferritin molecules.
Biochem. Biophys. Acta 207:256-258 (1970)
90. DRYSDALE, J.W., SINGER, R.M:
Carcinofetal human iso-ferritins in placenta and HeLa-cells.
Cancer Res. 34: 3352-3354 (1974)
91. DRYSDALE, J.W., ADELMAN, T.G., AROSIO, P., CASAREALE, D.,
FITZPATRICK, P., HAZARD, J.T., YOKOTA, M:
Human iso-ferritins in normal and disease states
Semin. Haematol. 14: 71-88 (1977)
92. DRYSDALE, J.W:
Ferritin gene expression.
In: Ferritins and iso-ferritins as biochemical markers,
Albertini, A., Arosio, P., Chiancone, E., Drysdale, J.
(Hrsg.), Elsevier science publishers, Amsterdam, New
York, Oxford, S. 87-96 (1984)

93. DUNN, C.D.R., BODEN, D.J:
Three commercial immunoradiometric "kit" assays for
serum ferritin evaluation.
Clin. Chem. 27(7): 1280-1283 (1981)
94. ESUMI, N., IKUSHIMA, S., TODO, S., IMASHUKU, S:
Hyperferritinaemia in malignant histiocytosis and
virus-associated hemophagocytic syndrome.
N. Engl. J. Med. 316(6): 346-347 (1987)
95. FINCH, C.A., HÜBERS, H.A., CAZZOLA, M., BERGAMASCHI,
G., BELLOTTI, V:
Storage iron.
In: Ferritin and isoferritins as biochemical markers,
Albertini, A., Arosio, P., Chiancone, E., Drysdale, J.
(Hrsg.), Elsevier science publishers, Amsterdam, New
York, Oxford, S.3-21 (1984)
96. FINEBERG, R.A., GREENBERG, D.M:
Ferritin biosynthesis.
II. Acceleration of synthesis by the administration
of iron.
J. Biol. Chem. 214: 97-106 (1955)
97. FISCHBACH, F.A., HARRISON, P.M., HOY, T.G:
The structural relationship between ferritin protein
and its mineral core.
J. Mol. Biol. 39: 235-238 (1969)
98. FORD, G.C., HARRISON, P.M., RICE, D.W., SMITH, I.M.A.,
TREFFRY, A., WHITE, J.L., YARIV, J:
Ferritin: design and formation of an iron storage molecule.
Philos. Trans. R. Soc. Lond., J. Biol. Sci. 304: 551(1984)
99. FORMAN, D.T., VYE, M.V:
Immunoradiometric serum ferritin concentration compa-
red with stainable bone-marrow iron as indices to iron
stores.
Clin. Chem. 26: 145 (1980)
100. FRENKEL, E.J., VAN DEN BELD, B., VAN OOST, B.A., MARX, J:
Influence of heat treatment on rabbit liver ferritin
kinetics.
Brit. J. Haematol. 55(3): 449-453 (1983)
101. FRENKEL, E.J., VAN DEN BELD, B., KÖNIG, B.W., MARX, J.J:
Preparative isolation of distinct molecular forms
of rabbit liver ferritin using high-performance liquid
chromatographie.
Analyt. Biochem. 135: 489-494 (1983)
102. GABUZDA, T.G., PEARSON, J,;
Biochim. Biophys. Acta 194: 50-54 (1969)

103. GHIELMI, S., PIZZOCCOLO, G., IACOBELLO, C., ALBERTINI, A., AROSIO, P:
Methodological effects on the quantitation of serum ferritin by radio- and enzyme- immunoassays.
Clin. Chim. Acta 120: 285-294 (1982)
104. GÖRG, A., POSTEL, W., WESTERMEIER, R:
Ultrathin-layer isoelectric focusing in polyacrylamid-gels on cellophane.
Anal. Biochem. 89: 60-70 (1978)
106. GÖRG, A., POSTEL, W., WESTERMEIER, R:
In: Praxis der elektrophoretischen Trennmethode.
Blasius, E., Wagner, H. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin (1985)
105. GÖRG, A., POSTEL, W., WESTERMEIER, R., RIGHETTI, P.G., EK, K:
Application Note Nr. 320, LKB Producter AB, Box 305, S. 16- 26, Bromma, Schweden (1981)
107. GOWAN, L.K., COLLAWN, J.F., FISH, N.W:
Separation by high-performance liquid chromatographie of two types of subunits from horse spleen ferritin.
J. Chromat. 264: 463-468 (1983)
108. GRAIL, A., HANCOCK, B.W., HARRISON, P.M:
Serum ferritin in normal individuals and in patients with malignant lymphoma and chronic renal failure measured with seven different commercial immunoassay techniques.
J. Clin. Pathol. 35: 1204 (1982)
109. GRAIL, A., BATES, G., WARD, A.M., JONES, W.G., HANCOCK, B.W:
Serum ferritin as a third marker in germ cell tumours.
Europ. J. Cancer Clin. Oncol. 18: 261-269 (1982)
110. GRANICK, S:
Ferritin: Its properties and significance for iron metabolism.
Chem. Rev. 38: 379-403 (1946)
111. GRANICK, S:
Structure and physiological function of ferritin.
Physiol. Rev. 31: 489 (1951)
112. GREEN, R., WATSON, L.R., SAAB, G.A., CROSBY, W.H:
"Normal" serum ferritin- a caution.
Blood 50: 545-547 (1977)
113. GROPP, C., LEHMANN, F.G., BAUER, H., HAVEMANN, K:
Serum ferritin levels in patients with lung cancer before and during therapy and in comparison to CEA determinations.
In: Lehmann, F.G. (Hrsg.), Carcino-Embryonic Proteins, Vol.II, Elsevier/North-Holland, Biomedical Press, S.451 (1979)

114. GUILLEUX, F., WAGNER, A:
A new radioimmunoassay of serum ferritin: use of ^{125}J -labelled human spleen antigen and a solid phase second antibody.
Int. J. Nucl. Med. Biol. 8: 17-26 (1981)
115. GUPTA, S., IMAM, A., LICORISH, K:
Serum ferritin in aquired immune deficiency syndrome.
J. Clin. Lab. Immunol. 20: 11-13 (1986)
116. HALLIDAY, J.W., Mc KEERING, L.V., POWELL, L.W:
Isoferritin composition of tissues and serum in human cancers.
Cancer research 36: 4486 (1976)
117. HALLIDAY, J.W., Mc KEERING, L.V., TWEEDALE, R., POWELL, L.W;
Br. J. Haematol. 57: 679-684 (1984)
118. HANCOCK, B.W., BRUCE, L., MAY, K., RICHMOND, J:
Ferritin, a sensitizing substance in the leucocyte migration inhibition test in patients with malignant lymphoma.
Brit. J. Haematol. 43: 223-233 (1979)
119. HANN, H.L., STAHLHUT, M.W., EVANS, A.E:
Isoferritins and prognosis of neuroblastoma: the immunological role of acidic isoferritins.
In: Ferritins and isoferritins as biochemical markers, Albertini, A., Arosio, P., Chiancone, E., Drysdale, J. (Hrsg.), Elsevier science publishers, Amsterdam, New York, Oxford, S.171-180 (1984)
120. HANN, H.L., EVANS, A.E., SIEGEL, S.E., WONG, K.Y., SATHER, H., DALTON, A., HAMMOND, D., SEEGER, R.C:
Prognostic importance of serum ferritin in patients with stages III and IV Neuroblastoma: The childrens cancer study group experiences.
Cancer Res. 45: 2843-2848 (1985)
121. HARRISON, P.M:
The structure of apoferritin: molecular size, shape and symmetry from x-ray data.
J. Mol. Biol. 6: 404-411 (1963)
122. HARRISON, P.M., FISCHBACH, F.A., HOY, T.G. HAGGIS, G.H:
Ferric oxyhydroxid core of ferritin.
Nature 216: 1188-1192 (1967)
123. HARRISON, P.M., HOY, T.G., MACARA, B.G., HOARE, R.J:
On ferritin heterogeneity. Further evidence for heteropolymers.
J. Biol. Chem. 253: 4451-4458 (1978)

124. HARRISON, P.M., RANYARD, S.H., HOARE, R.J., RUSSELL, S.M., TREFFRY, A:
The structure and function of ferritin.
In: Ciba Found. Symp. Iron Metabolism, Amsterdam, Elsevier 51: 19-35 (1977)
125. HAZARD, J.T., AROSIO, P., DRYSDALE, J.W:
Selective quantitation of "carcinofetal" isoferritins in radioimmunoassay.
In: Fishman, W.H., Sell, S. (Hrsg.), Onco-developmental gene expression, Acad. Press Inc. N.Y., S. Franc., London, S. 749 (1976)
126. HAZARD, J.T., DRYSDALE, J.W:
Ferritinemia in cancer.
Nature 265: 755-756 (1977)
127. HAZARD, J.T., YOKOTA, M., AROSIO, P., DRYSDALE, J.W:
Immunological differences in human isoferritins: implications for immunologic quantitation of serum ferritin.
Blood 49: 139-146 (1977)
128. HESRHO, C., COOK, J.D., FINCH, C.A:
Storage iron kinetics VI. The effect of inflammation on iron exchange in the rat.
Br. J. Haematol. 28: 67-75 (1974)
129. HEUKESHOVEN, J., DERNICK, R:
Elektrophoreseforum '83.
Radola, B.J. ed., München: 92-97 (1983)
130. HEUTERSPREUTE, M., CRICHTON, R.R:
Amino acid sequence of horse spleen apoferritin.
FEBS Lett. 129: 322-325 (1981)
131. HIJMANS, W., SCHUTT, H.R., KLEIN, F:
An immunofluorescence procedure for the detection of intracellular immunoglobulins.
Clin. Exp. Immunol. 4: 457 (1969)
132. HOARE, R.J., HARRISON, P.M., HOY, T.G:
Structure of horse-spleen apoferritin on 6 Å resolution.
Nature 255: 653-654 (1975)
133. HOFMANN, T., HARRISON, P.M:
The structure of apoferritin: degradation into and molecular weight of subunits.
J. Mol. Biol. 6: 256-267 (1963)
134. HOY, T.G., JACOBS, A:
Ferritin polymers and the formation of haemosiderin.
Brit. J. Haematol. 49: 593-602 (1981)

135. HUEBERS, H.A., CSIBA, E., HUEBERS, E., FINCH, C.A:
Competitive advantage of diferric transferrin in delivering iron to reticulocytes.
Proc. Natl. Ac. Sci. USA 80: 300-304 (1983)
136. HUEBERS, H., RUMMEL, W:
Protein mediated epithelial iron transfer.
In: Handbook of Experimental Pharmacology, Csaky, T.Z. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, 13:513-541 (1984)
137. HUNTER, W.M:
Radioimmunoassay.
In: WEIR, D.M., Handbook of experimental immunology, 2nd Ed. Kap. 17. Publ. Blackwell Scientific Publ. Oxford/London/Edinburgh/Melbourne (1973)
138. IMAGAWA, M., YOSHITAKE, S., IHIKAWA, E., NIITSU, Y., URUSHIZAKI, I., KANAZAWA, R., TACHIBANA, S., NAKAZAWA, N., OGAWA, H:
Development of a highly sensitive sandwich enzyme immunoassay for human ferritin using affinity-purified anti-ferritin labelled with β -D galactosidase from *Escherichia coli*.
Clin. Chim. Acta 121: 277-289 (1982)
139. INTERNATIONAL COMMITTEE FOR STANDARDIZATION IN HAEMATOLOGY (EXPERT PANEL ON IRON):
Proposed international standard of human ferritin for the serum ferritin assay.
Br. J. Haematol. 61: 61-63 (1985)
140. ISHIKAWA, K., NARITA, O., SAITO, H., KATO, K:
Determination of ferritin in urine and in serum of normal adults with a sensitive enzyme immunoassay.
Clin. Chim. Acta 123: 73-81 (1982)
141. ISHITANI, K., NIITSU, Y., LISTOWSKY, J:
Subunit structure and heterogeneity of ferritin.
Fed. Proc. 33: 1478 (1974)
142. ISHITANI, K., NIITSU, Y., LISTOWSKY, J:
Characterization of the different polypeptide components and analysis of subunit assembly in ferritin.
J. Biol. Chem. 250: 3142-3148 (1975)
143. ISHITANI, K., NIITSU, Y., LISTOWSKY, J:
Ferritin subunits structure and heterogeneity.
In: Proteins of iron storage and transport in Biochemistry and Medicine, Chrichton, R.R. ed., North-Holland, Amsterdam/American Elsevier, New York: 245-251 (1975)
144. ISHITANI, K., NIITSU, Y., WATANABE, N., KOSEKI, J., OIKAWA, J., KADONO, Y., ISHII, T., GOTO, Y., ONODERA, Y:
Clinical evaluation of serum ferritin for serodiagnosis of cancer.
In: Lehmann, F.G. (Hrsg.), Carcino-Embryonic Proteins, Vol. I, Elsevier/North-Holland, Biomed. Press: 279-285 (1979)

145. ITO, H., TAGAKI, Y., ANDO, Y., KUBO, A., HASHIMOTO, S., TSUTSUI, F., KURIHARA, S:
Serum ferritin levels in patients with cervical cancer.
Obstet. &Gyn. 55: 358-362 (1980)
146. JAKOBS, A., SLATER, A., WHITTAKER, J.A., CANELLOS, G., WIERNIK, P.H:
Serum ferritin concentration in untreated Hodgkin's disease.
Br. J. Cancer 34: 162-166 (1976)
147. JACOBS, A., JONES, B., RICKETTS, C., BULBROOK, R.D., WANG, D.Y:
Serum ferritin concentration in early breast cancer.
Brit. J. Cancer 34: 286-290 (1976)
148. JAKOBS, A:
Serum ferritin and iron stores.
Fed. Proc. 36: 2024-2027 (1977)
149. JACOBS, A., WORWOOD, M:
Iron in Biochemistry and Medicine II.
Ac. Press. London, New York: 203-244 (1980)
150. JAKOBS, A., PETERS, S.W., BAUMINGER, E.R., EIKELBOOM, J., OFER, S., RACHMILEWITZ, E.A:
Ferritin concentration in normal and abnormal erythrocytes measured by immunoradiometric assay with antibodies to heart and spleen ferritin and Mössbauer spectroscopy.
Brit. J. Haematol. 49: 201-207 (1981)
151. JAKOBS, A., SUMMERS, M.R:
Iron uptake and ferritin synthesis by peripheral blood leucocytes in patients with primary idiopathic haemochromatosis.
Br. J. Haematol. 49: 649-652 (1981)
152. JAKOBS, A., HODGETTS, J., HOY, T.G:
Functional aspects of isoferritins.
In: Ferritins and isoferritins as biochemical markers, Albertini, A., Arosio, P., Chiancone, E., Drysdale, J. (Hrsg.), Elsevier science publishers, Amsterdam, New York, Oxford, S.113-127 (1984)
- 151a. JAKOBS, A:
Do acidic isoferritins regulate haemopoiesis?
Br. J. Haematol. 55: 199-202 (1983)
153. JAKOBS, A:
Serum ferritin in malignant tumours.
Med. Oncol. Tumor Pharmacother. 1: 149-156 (1984)

154. JAIN, S.K., BARRETT, K.J., BOYD, D., FAVREAN, M.F., CRAMPTON, J., DRYSDALE, J.W:
Ferritin H- and L-chains are derived from different multigene-families.
J. Biol. Chem. 260: 11762-11768 (1985)
155. JONES, P.A.E., MILLER, F.M., WORWOOD, M., JACOBS, A:
Ferritinaemia in leukaemia and Hodgkin's disease.
Br. J. Cancer 27: 212-217 (1973)
156. JONES, B.M., WORWOOD, M:
An immunoradiometric assay for the acidic ferritin of human heart: Application to human tissues, cells and serum.
Clin. Chim. Acta 85: 81-88 (1978)
157. JONES, T., SPENCER, R., WALSH, C:
Mechanism and kinetics of iron release from ferritin by dihydroflavins and dihydroflavin analogues.
Biochemistry 17: 4011-4017 (1978)
159. JONES, B.M., WORWOOD, M., JACOBS, A:
Isoferritins in normal leucocytes.
Br. J. Haematol. 55: 73-81 (1983)
160. JONES, B.M., WORWOOD, M., JACOBS, A:
Serum ferritin in patients with cancer: Determination with antibodies to HeLa-cell- and spleen-ferritin.
Clin. Chim. Acta 106: 203-214 (1980)
161. KANEKO, Y., MASEKI, N., TAKASAKI, N., SAKURAI, M., HYASHI, Y., NAKAZAWA, S., MORI, T., TAKEDA, T., SHIKANO, T., HIYOSHI, J:
Clinical and haematologic characteristics in acute leukemia with 11q23 translocations.
Blood 67: 484-491 (1986)
161. KEW, M.C., TORRANCE, J.D., DERMAN, D., SIMON, M., MACNAB, G.M., CHARLTON, R.W., BOTHWELL, T.H:
Serum and tumour ferritins in primary liver cancer.
Gut 19: 294-299 (1978)
163. KOHGO, Y., YOKOTO, M., DRYSDALE, J.W:
Differential turnover of rat liver isoferritins.
J. Biol. Chem. 225: 5195-5200 (1980)
164. KOLLER, M.E., ROMSLO, I., FINNE, P.H., HANEBERG, B:
Serial determinations of serum ferritin in children with acute lymphoblastic leukemia.
Acta Paediatr. Scand. 68: 93-96 (1979)
165. KONIJN, A.M., TAL, R., LEVY, R., MATZNER, Y:
Isolation and fractionation of ferritin from human term placenta - a source for human isoferritins.
Analyt. Biochem. 144: 423 (1985)

166. KOPRIVOVA, H., HERMANSKA, Z., NOVAK, F., BLELOVA, Z., DIENSTBIER, Z:
Ferritin-bearing lymphocytes in Hodgkin's disease.
Neoplasma 33: 63-69 (1986)
167. LAMERZ, R., FATEH-MOGHADAM, A:
Radioimmunologische Bestimmung von Immunglobulin E.
Klin. Wschr. 52: 18 (1974)
168. LAMERZ, R., GIRG, R., HENNEKE, H., HORKA, G., SEGURA, E:
Immunological investigations in lung cancer.
In: Lehmann, F.G. (Hrsg.), Carcino-Embryonic Proteins,
Vol. II, Elsevier/North-Holland, Biomedical Press,
S. 559 (1979)
169. LANG, J.M., EBER, M., METHLIN, G., OBERLING, F:
Serum ferritin during the course of chronic myeloid
leukemia - increase of serum ferritin as a marker of
dyserythropoiesis.
Acta Haematol. 67: 145-149 (1982)
170. LAUFBERGER, V:
Sur la cristallisation de la ferritin.
Bull. Soc. Chim. Biol. 19: 1575-1582 (1937)
171. LAURELL, C.B:
Quantitative estimation of proteins by elektrophoresis
in agarose gel containing antibodies.
Anal. Biochem. 15: 45-52 (1966)
172. LAVOIE, D.J., MARCUS, D.M., ISHIKAWA, K., LISTOWSKY, Y:
Ferritin and apoferritin from human liver: aspects of
heterogeneity.
In: Proteins of iron metabolism, Brown, E.B., Aisen, P.,
Fielding, J., Crichton, R.R. (Hrsg.), New York, Grune &
Stratton, S. 71-78 (1977)
173. LAVOIE, D.J., MARCUS, D.M., OTSUKA, S., LISTOWSKY, I:
Characterization of ferritin from human placenta. Im-
plications for analysis of tissue specificity and micro-
heterogeneity of ferritins.
Biochim. Biophys. Acta 579: 359 (1979)
174. LEBO, R.V., KAN, Y.W., CHANG, M.C., JAIN, S., DRYSDALE, J:
Human ferritin light chain gene sequences mapped to se-
veral sorted chromosomes.
Hum. Genet. 71: 325-328 (1985)
175. LEE, J.C.K., RICHTER, G.W:
A study of two types of ferritin from rat hepatomas.
Cancer Res. 30: 880-888 (1970)
176. LEE, S.S.C., RICHTER, G.W:
The monomers and oligomers of ferritin and apoferritin:
Association and dissociation.
Biochemistry 15: 65-70 (1976)

177. LEIBOLD, E.J., HAZIZ, N., BROWN, A.J.P., MUNRO, H.;
J. Biol. Chem. 259: 4327-4334 (1984)
178. LEIFHEIT, H.J., GATHOF, A.G., WEIDINGER, S:
Klassifizierung der Faktor XIII B Allotypen mit der
isoelektrischen Fokussierung.
Ärztl. Lab. 5 (1985)
179. LEVI, S., CESARENI, G., AROSIO, P., LORENZETTI, R.,
SORIA, M., SOLLAZZO, M., ALBERTINI, A., CORTESE, R:
Characterization of human ferritin H-chain synthesized
in *Escherichia coli*.
Gene 51: 269-274 (1987)
180. LINDER-HOROWITZ, M., RUETTINGER, R.T., MUNRO, H.N:
Iron induction of electrophoretically different ferri-
tins in rat livers, heart and kidney.
Biochim. Biophys. Acta 200: 442-448 (1969)
181. LINDER-HOROWITZ, M., RUETTINGER, R.T., MUNRO, H.N:
Iron induction of electrophoretically different ferri-
tins in rat liver, heart and kidney.
Biochim. Biophys. Acta 200: 442-448 (1969)
182. LINDER, M.C., MUNRO, H.N:
Assay of tissue ferritin.
Anal. Biochem. 48: 266-278 (1972)
183. LINDER, M.C., MUNRO, H.M:
Metabolic and chemical features of ferritins: A series of
iron-inducible tissue proteins.
Am. J. Pathol. 72: 263-288 (1973)
184. LINDER, M.C., NAGEL, G.M., ROBOZ, M., HUNGERFORD, D.M:
The size and shape of heart and muscle ferritins ana-
lyzed by sedimentation, gel filtration and elektro-
phoresis.
J. Biol. Chem. 256: 9104 (1981)
185. LINDER, M.C., WRIGHT, K., MADARA, J:
Concentration, structure and iron saturation of ferri-
tins from normal human lung and lung tumors with gra-
ded histopathology.
Enzyme 27: 189 (1982)
186. LINET, J.N., COLLET-CASSART, D., MAGNUSSON, C.G.M:
Particle counting immunoassay (PACIA) of ferritin.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 20: 141-146 (1982)
187. LINKESCH, W., AIGINGER, P., KÜHBÖCK, J:
Ferritin- ein tumorassoziiertes Protein bei Hodentu-
moren.
Der Nuklearmediziner 24: 379-384 (1980)

188. LINPISARN, S., KRICKA, L., KENNEDY, J.H., WHITEHEAD, T:
Sensitive sandwich enzyme immunoassay for serum ferritin on microtitre plates.
Ann. Chim. Biochem. 18: 48-53 (1981)
189. LIPSCHITZ, D.A., COOK, J.D., FINCH, C.A:
A clinical evaluation of serum ferritin as an index of iron stores.
N. Engl. J. Med. 290: 1213-1216 (1974)
190. LIPSCHITZ, D.A., SKIKNE, B.A., THOMPSON, C:
Precision and accuracy of serum ferritin measurements.
Am. J. Clin. Nutr. 34: 951-956 (1981)
191. Fa, LKB:
Instruction for LKB Ampholine PAG-Plates, Product Nr. 1804-102.
192. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J:
Protein measurement with the Folin-Phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193 (1951)
193. LUNDIN, L., HÄLLGREN, R., BIRGEgard, G., WIDE, L:
Serum ferritin in alcoholics and the relation to liver damage, iron state and erythropoietic activity.
Acta Med. Scand. 209: 327-331 (1981)
194. LUXTON, A.W., WALKER, W.H., GAULDIE, J., ALI, M.A., PELLETIER, C:
Radioimmunoassay for serum ferritin.
Clin. Chem. 23: 683-689 (1977)
195. LUZZAGO, A., AROSIO, P., IACOBELLO, C., RUGGERI, G., CAPUCCI, J., BROCCHI, E., DE SIMONE, F., GAMBA, D., GABRI, E., LEVI, S., ALBERTINI, A:
Immunochemical characterization of human liver and heart ferritins with monoclonal antibodies.
Biochim. Biophys. Acta 872: 61-71 (1986)
196. MACARON, C.I., MACARON, Z.G:
Increased serum ferritin levels in hyperthyroidism.
Ann. Internal. Med. 96: 617-618 (1982)
197. MACK, U., POWELL, L.W., HALLIDAY, J.W:
Detection and isolation of a hepatic membrane receptor for ferritin.
J. Biol. Chem. 258(8): 4672-4675 (1983)
198. MARCUS, D.M., ZINBERG, N:
Isolation of ferritin from human mammary and pancreatic carcinomas by means of antibody immunoadsorbents.
Arch. Biochem. Biophys. 162: 493-501 (1974)

199. MARCUS, D.M., ZINBERG, N:
Measurement of serum ferritin by radioimmunoassay:
Results in normal individuals and patients with breast
cancer.
J. Natl. Cancer Inst. 55: 791-795 (1975)
200. MARCUS, D.M., ZINBERG, N., LISTOWSKY, I:
Ferritin.
In: Herberman, R.B., Mc Intire, K.R. (Hrsg.), Immu-
nodiagnosis of cancer, M. Dekker Inc. N.Y., Basel
S. 473 (1979)
201. MARESHAL, J.C., DURIE, B., WUSTEFELD, C., CHARLIER, G.,
CRICHTON, R.R:
Immunological characteristics of human ferritins, con-
sequences for human serum ferritin determination.
Clin. Chim. Acta 111: 99-103 (1981)
202. MASSOVER, W.H:
Ultrastructural analysis of the disruption of ferritin
by acetone.
In: Bailey, G.W. (Hrsg.), 35th Ann. Proc. Electron
Microscop. Soc. Amer. Boston 1977
203. MASSOVER, W.H:
Molecular size heterogeneity of ferritin in mouse liver.
Biochim. Biophys. Acta 829: 377-386 (1985), Elsevier
204. MATZNER, Y., KONIJN, A.M., HERSHKO, C:
Serum ferritin in hematologic malignancies.
Am. J. Hematol. 9: 13-22 (1980)
205. MELIA, W.M., BULLOCK, S., JOHNSON, P.J., WILLIAMS, R:
Serum ferritin in hepatocellular carcinoma. A compari-
son with alphafetoprotein.
Cancer 51: 2112-2115 (1983)
206. MICALI, B., FLORID, M.A., VENUTI, A., GIORGIANNI, G.,
SAITA, F.P:
The significance of tumor marker assay in the staging
of breast cancer. Assessment of ferritin and beta-HCG
levels.
J. Nucl. Med. All. Sci. 25: 65-70 (1981)
207. MILES, L.E.M., LIPSCHITZ, D.A., BIEBER, C.P., COOK, J.D:
Measurement of serum ferritin by a 2-site immunoradio-
metric assay.
Anal. Biochem. 61: 209 (1974)
208. MOROZ, C., LAHAT, N., BINIAMINOV, M., RAMOT, B:
Ferritin on the surface of lymphocytes in Hodgkin's
disease patients.
Clin. Exp. Immunol. 29: 30-35 (1977)

209. MOROZ, C., KAN, M., CHANIOF, C., MARCUS, H., KUPFER, B., CUCKLE, H.S:
Ferritin-bearing lymphocytes in the diagnosis of breast cancer.
Cancer 54: 84-89 (1984)
210. MOROZ, C., KUPFER, B., TWIG, S., PARHAMI-SEREN, B:
Preparation and characterization of monoclonal antibodies specific to placenta ferritin.
Clin. Chim. Acta 148: 111-118 (1985)
211. MUFTI, G.J., HAMBLIN, T.J., STEVENS, J:
Basic isoferritin and hypercalcaemia in renal cell carcinoma.
J. Clin. Pathol. 35: 1008-1010 ((1982)
212. MUNRO, H.N., LINDER, M.C., HABERMAN, M., CABIMPOOLAS, N:
Ferritins from normal and malignant human tissues.
In: Proteins of iron storage and transport in Biochemistry and Medicine, Crichton, R.R. ed., Amsterdam/North-Holland, S. 223-229 (1975)
213. MUNRO, H.N., LINDER, M.C:
Ferritin: Structure, biosynthesis and role in iron metabolism.
Physiol. Rev. 58(2): 317-393 (1978)
214. NAKANO, S., KUMADA, T., SAGIYAMA, K., WATAHIKI, H., TAKEDA, I:
Clinical significance of serum ferritin determination for hepatocellular carcinoma.
Am. J. Gastroent. 79/8: 623-627 (1984)
215. NIEDERER, W:
Ferritin iron incorporation and iron release.
Experientia 26: 218-220 (1970)
216. NIITSU, Y., LISTOWSKY, I:
The distribution of iron in ferritin.
Arch. Biochem. Biophys. 158: 276-281 (1973)
217. NIITSU, Y., LISTOWSKY, I:
Mechanisms for the formation of ferritin oligomers.
Biochemistry 12: 4690-4695 (1973)
218. NIITSU, Y., OHTSUKA, S., YOHGO, Y., WATANABE, N., KOSEKI, J., URUSHIZAKI, I:
Hepatoma ferritin in tissue and serum.
Tumor Res. 10: 31-41 (1975)
219. NIITSU, Y., KOHGO, Y., OHTSUKA, S., WATANABE, N., KOSEKI, J., SHIBATA, K., ISHITANI, K., NAGAI, T., GOCHO, Y., URUSHIZAKI, I:
Ferritins in serum and tissue and their implications

in malignancy.

In: Fishman, W.H., Sell, S. (Hrsg.), Onco-Developmental Gene Expression, Academic Press Inc. N.Y., S. Franc., London, S. 757-762 (1976)

220. NIITSU, Y., ONODERA, Y., KOHGO, Y., GOTO, Y., WATANABE, N., URUSHIZAKI, J:
Isoferritins in malignant diseases.
In: Ferritins and isoferritins as biochemical markers, Albertini, A., Arosio, P., Chiancone, E., Drysdale, J. (Hrsg.), Elsevier science publishers, Amsterdam, New York, Oxford, S. 159-169 (1984)
221. NITTI, D., FABRIS, C., DEL FAVERO, G., FARINI, R., GRASSI, F., FARINI, A., BACCAGLINI, V., PECHRAZZOLI, S., PICCOLI, A., LISE, M., NACCARATO, R:
Serum ferritin in Pancreatic Disease.
Digestion 25: 258-262 (1982)
222. OERTEL, J., GERHARTZ, H:
Die Ferritinkonzentration im Serum bei verschiedenen Typen der Eisenmangelanämie.
DMW 102: 1147-1150 (1977)
223. OKTAVE, J.N., SCHNEIDER, Y.J., SIBILLE, J.C., CRICHTON, R.R., TROUET, A:
Transferrin protein and iron uptake by cultured mammalian cells.
In: Protides of the biological fluids, Peeters ed., Brussel 31: 77-80 (1983)
224. OTSUKA, S., LISTOWSKY, I:
High-resolution preparative elektrochromatographie for purification of two subunit types of ferritin.
Analyt. Biochem. 102: 419 (1980)
225. OTSUKA, S., LISTOWSKY, I., NIITSU, Y., URUSHIZAKI, I:
Assembly of intra- and interspecies hybrid apoferritins.
J. Biol. Chem. 255(13): 6234-6237 (1980)
226. OTSUKA, S., MARUYAMA, H., LISTOWSKY, I:
Structure, assembly, conformation and immunological properties of the two subunit classes of ferritin.
Biochemistry 20: 5226-5232 (1981)
227. OUCHTERLONY, Ö:
Diffusion-in-gel methods for immunological analysis.
Progress in Allergy 5: 1 (1958)
228. PAGE, M., THERIAULT, M., CARON, M:
Serum ferritin in the evaluation of leukemia patients and its synthesis in cell culture.
In: Lehmann, F.G. (Hrsg.), Carcino-embryonic Proteins Vol. II, Elsevier/North-Holland, Biomed. Press, S.455-459, (1979)

229. PAGE, M., THERIAULT, L., NILSSON, M:
Solid phase ELISA for serum ferritin.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 40: 641-645 (1980)
230. PAGE, M., LAGUEUX, J., GAUTHIER, C:
A three step purification procedure for human liver
ferritin.
Can. J. Biochem. 58: 494 (1980)
231. PALERMO, C., MADDALI BONGI, S., BIANUCCI, G:
Relationship between serum ferritin, iron stores and
disease activity in rheumatoid arthritis.
La Ricerca Clin. Lab. 16: 463 (1986)
232. PAPENHAUSEN, P.R., EMESON, E.E., CROFT, C.B., BORO-
WIECKI, B:
Ferritin-bearing lymphocytes in patients with cancer.
Cancer 53(2): 267-271 (1984)
233. PARELL, L.W., HALLIDAY, J.W., McKEERING, L.V:
Studies of serum ferritin with emphasis on its impor-
tance in clinical medicine.
In: Proteins of iron storage and transport in Biochemi-
stry and Medicine, Crichton, R.R. (Hrsg.), North-Holland,
Amsterdam, Elsevier: New York, S. 215-221 (1975)
234. PARRY, D.M., WORWOOD, M., JACOBS, A:
Serum ferritin in acute leukemia at presentation and
during remission.
Br. J. Med. 1: 245-247 (1975)
235. PENDERS, T.J., DE ROOIJ-DIJK, H.H., LIEJNSE, B:
Rapid isolation of ferritin by means of ultracentrifuga-
tion.
Biochim. Biophys. Acta 168: 588-590 (1968)
236. PERLER, F., EFSTRATIADIS, A., LOMEDICO, P., GILBERT,
W., KALODNER, R., DODGSON, J:
The evolution of genes: The chicken pre-proinsulin gene.
Cell 20: 555-556 (1980)
237. PETERS, S., JACOBS, A., FITZSIMONS, E:
Erythrocyte ferritin in normal subjects and patients
with abnormal iron metabolism.
Brit. J. Haematol. 53: 211-216 (1983)
238. PHARNACIA:
Sephacrose 2B-4B-6B in Perflorm.
Pharmacia Fine Chemicals Uppsala, Schweden 1969
239. PHARMACIA:
Affinity chromatographie. Principles and methods.
Pharmacia Fine Chemicals Uppsala, Schweden, 1977

240. POLLACK, M.S., DA SILVA, B., MOSHIEF, R.C., GROSHEN, S., BOGNACKI, J., DUPONT, B., DE SOUZA, M:
Ferritin secretion by human mononuclear cells: Association with HLA-Phenotype.
Clin. Immunol. Immunopathol. 27: 124-134 (1983)
241. POWELL, L.W., ALPERT, E., ISSELBACHER, K.J., DRYSDALE, J:
Abnormality in tissue isoferritin distribution in idiopathic haemochromatosis.
Nature, London 250: 333-335 (1974)
242. POWELL, L.W., ALPERT, E., ISSELBACHER, K., DRYSDALE, J.W:
Human isoferritins: Organ specific iron and apoferritin distribution.
Brit. J. Haematol. 30: 47-55 (1975)
243. RANYARD, S.H., STAMMERS, D.K., HARRISON, P.M:
Electron density map of apoferritin at 2,8 Å resolution.
Nature, 271: 282-284 (1978)
244. REISSMAN, K.R., DIETRICH, M.R:
On the presence of ferritin in peripheral blood of patients with hepatocellular disease.
J. Clin. Invest. 35: 588-595 (1956)
245. RHYNER, K., TAETHE, R:
Wechselbeziehung zwischen Transferrinrezeptor-Expression und intrazellulärer Ferritinkonzentration an Leukämiezellen und normalen Markzellen.
Schweiz. med. Wschr. 116: 1484-1487 (1986)
246. RICE, D.W., FORD, G.G., WHITE, J.L., SMITH, I.M.A., HARRISON, R.M:
Ferritin structure and function.
In: Protides of the biological fluids, Peeters ed., Brussel 31: 195-198 (1983)
247. RICHTER, G.W:
Studies of hemosiderosis with the aid of electron microscopy.
J. Exptl. Med. 106: 203-218 (1957)
248. RICHTER, G.W:
Comparison of ferritin from neoplastic and non-neoplastic human cells.
Nature 207: 616-618 (1965)
249. RITTLING, S.R., WOODWORTH, R.C:
The synthesis and turnover of ferritin in rat L-6 cells. Rates and response to iron, actinomycin D and desferrioxamine.
J. Biol. Chem. 259: 5561-5566 (1984)
250. ROBERTS, D.D., DRYSDALE, J.W:
Immunoreactivities of human isoferritins.
Clin. Chim. Acta 150: 41-51 (1985)
251. RODBARD, D., BRIDSON, W., RAYFORD, P.L:
Rapid calculation of radioimmunoassay results.
J. Lab. Clin. Med. 74: 770-778 (1969)

252. RODBARD, D., FELDMAN, Y:
Kinetics of two-site immunoradiometric ("sandwich") assay I. Mathematical model for simulation, optimization and curve fitting.
Immunochem. 15(2): 71 (1978)
- 253 .RUGGERI, G., IACOBELLO, C., ALBERTINI, A., BROCCHI, E., LEVI, S., GABRI, E., AROSIO, P:
Studies of human isoferritins in tissues and body fluids.
In: Ferritins and isoferritins as biochemical markers, Albertini, A., Arosio, A., Chiancone, E., Drysdale, J. (Hrsg.), Elsevier science publishers, Amsterdam, New York, Oxford, S. 67-78 (1984)
- 253a. RYALL, R. G., RUMPF, J:
Changes in sample isoferitin composition as a possible cause of dilutional discrepancies in ferritin 2-site immunoradiometric assay results.
Ann. Clin. Biochem. 23: 172-179 (1986)
254. SAAB, G., GREEN, R., JURGUS, A., SARRON, E:
Monocyte ferritin in idiopathic haemochromatosis, thalassaemia and liver disease.
Scand. J. Haematol. 36: 65-70 (1986)
- 254a. SACHS, L:
Statistische Auswertungsmethoden.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1972)
255. SANTAMBROGIO, P., COZZI, A., LEVI, S., AROSIO, P:
Human serum ferritin G-peptide is recognized by anti-L ferritin subunit antibodies and concanavalin-A.
Br. J. Haematol. 65: 235-237 (1987)
256. SARCIONE, E.J., SMALLEY, J.R., LEMA, M.J., STUTZMAN, L:
Increased ferritin synthesis and release by Hodgkin's disease peripheral blood lymphocytes.
Int. J. Cancer 20: 339-346 (1977)
257. SELDEN, C., OWEN, M., HOPKINS, J.M.P:
Studies on the concentration and intracellular localization of iron proteins in liver biopsy specimens from patients with iron overload with special reference to their role in lysosomal disruption.
Br. J. Haematol. 44: 539-603 (1980)
258. SHINJYO, S., ABE, H., MASUDA, M:
Carbohydrate composition of horse spleen ferritin.
Biochim. Biophys. Acta 411: 165-167 (1975)
259. SIMON, P., BONU, F., GUEZENNEC, M., TANQUEREL, T., KSANG, P:
La surcharge en fer chez les patients hémodialisés;

traitement par la desferroxiamine.
Nephrologie 2: 165-169 (1981)

260. VAN SNICK, J., MASSON, P.L., HEREMANS, J.F:
The affinity of lactoferrin for the RES as the molecular basis for the hyposideraemia of inflammation.
In: Proteins of iron storage and transport in Biochemistry and Medicine, Crichton, R.R. (Hrsg.), North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1975
261. DE SOUSA, M., SMITHEYMAN, A., TAN, C:
Suggested models of ecotaxopathy in lymphoreticular malignancy. A role for iron-binding proteins in the control of lymphoid cell migration.
Am. J. Pathol. 90: 497-520 (1981)
262. STEINHOFF, G., VAN DER HEUL, C., VAN EIJK, H., RICE, L., ALFREY, C:
Elevated lymphocyte surface ferritin in malignant diseases and mononucleosis infection. A lymphocyte ferritin antibody binding test.
In: Ferritin and isoferritins as biochemical markers, Albertini, A., Arosio, P., Chiancone, E., Drysdale, J., (Hrsg.), Elsevier science publishers, Amsterdam, New York, Oxford, S. 181-184 (1984)
263. STRANDBERG-PEDERSEN, N., AXELSEN, N.H., BOOK, E., NORGAAARD-PEDERSEN, B.A:
A paper disc 2-site immunoradiometric assay for ferritin. In: Protides of biological fluids, 24th Colloquium 1976, Proteins and related subjects, Vol. 24 (1976)
264. TAKAMATSU, J., MAJIMA, M., MIKI, K., KUMA, K., MOZAI, T:
Serum ferritin as a marker of thyroid hormone action on peripheral tissues.
J. Clin. Endocrin. Metab. 61(4): 672-676 (1985)
265. TATSUTA, M., YAMAMURA, H., IISHI, H., KASUGAI, H., OKUDA, S:
Value of serum alpha-fetoprotein and ferritin in the diagnosis of hepatocellular carcinoma.
Oncology 43: 306-310 (1986)
266. URUSHIZAKI, I., NIITSU, Y., KOHGO, Y:
Clinical significance of serum ferritin in malignant diseases.
In: Cancer detection and prevention, II, Niebergs, H. E. ed., Marcel Dekker Inc., New York (1979)
267. VELIDA, T., AKITSUSI, T., KIMURA, H., TANAKA, T., MATSUDA, S., KARIYONE, S:
Relationship among plasma iron, plasma iron turnover and reticuloendothelial iron release.
Blood 61: 799-802 (1983)
268. VEZZONI, P., LEVI, S., GABRI, E., POZZI, M.R., SPINAZZE, S., AROSIO, P:
Ferritins in malignant and non-malignant lymphoid cells.
Br. J. Haematol. 62: 105-110 (1986)

269. VIDNES, A:
A single-site serum ferritin immunoradiometric assay-
a comparison between serum and liver ferritin stan-
dards and two antibody preparations.
Clin. Biochem. 15: 252-256 (1982)
270. VULIMIRI, L., CATSIMPOOLAS, N., GRIFFITH, A.L.,
LINDER, M.C., MUNRO, H.N:
Size and charge heterogeneity of rat tissue ferritins.
Biochim. Biophys. Acta 412: 148-156 (1975)
271. WAGSTAFF, M., WORWOOD, M., JACOBS, A:
Properties of human tissue isoferritins.
Biochem. J. 173: 969-977 (1978)
272. WAGSTAFF, M., WORWOOD, M., JACOBS, A:
Biochemical and immunological characterization of
ferritin from leukaemic cells.
Brit. J. Haematol. 45: 263 (1980)
- 272a. WALTERS, G.O., MILLER, F.M., WORWOOD, M:
Serum ferritin concentration and iron stores in nor-
mal subjects.
J. Clin. Pathol. 26: 770-772 (1973)
273. WANDS, J. R., ROWE, J.A., MEZEY, S.E., WATERBURY, L.A.,
WRIGHT, J.R., HALLIDAY, J.W., ISSELBACHER, K.J., PO-
well, L.W:
Normal serum ferritin concentrations in precirrhotic
hemochromatosis.
N. Engl. J. Med. 294: 302-305 (1976)
274. WATANABE, N., NIITSU, Y., KOSEKI, J., OIKAWA, J.,
KADONO, Y., ISHII, T., GOTO, Y., ONODERA, Y., URUSHI-
ZAKI, Y:
Ferritinemia in nude mice bearing various human carci-
nomas
In: Lehmann, F.G. (Hrsg.), Carcino-Embryonic Proteins,
Vol. I, Elsevier/North Holland, Biomed. Press, 1979
275. WATANABE, N., NIITSU, Y., OHTSUKA, S., KOSEKI, J.,
KOHGO, Y., URUSHIZAKI, I., KATO, K., ISHIKAWA, E:
Enzyme immunoassay for human ferritin.
Clin. Chem. 25(1): 80-82 (1979)
276. WATANABE, N., DRYSDALE, J:
Evidence for distinct mRNA's for ferritin subunits.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 98/2: 507-511 (1981)
- 276a. WATANABE, N., DRYSDALE, J:
Studies on heterogeneity in ferritin-subunits.
Bioch. Biophys. Acta 743: 98-105 (1983)

278. WEBER, K., OSBORN, M:
The reliability of molecular weight determination
by dodecyl-sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis.
J. Biol Chem. 244: 4406-4418 (1969)
279. WETZ; k., CRICHTON, R.R:
Ferritin. Struktur, Funktion und medizinische Aspekte.
Blut XXVII: 275-283 (1973)
280. WHITE, G.P., WORWOOD, M., PARRY, D., JACOBS, A:
Ferritin synthesis in normal and leucaemic leucocytes.
Nature 250: 584-586 (1974)
281. WHITE, G.P., BAILEY-Wood, R., JACOBS, A:
The effect of chelating agents on cellular iron me-
tabolism.
Clin. Sci. Mol. Med. 50: 145-152 (1976)
282. WHITTAKER, D., TORRANCE, J.D., KEW, M.C:
Isolation of ferritin from human hepatocellular carci-
noma.
Scand. J. Haematol. 33: 432-439 (1984)
283. WILLIAMS, M.A., HARRISON, P.M:
Electronmicroscopic and chemical studies of oligomers.
Biochemistry 15: 65-70 (1976)
284. WINTER, A., EK, K., ANDERSSON, U:
Analytical electrofocusing in thin layers of polyacryl-
amide gels, (1975)
285. WINTER, A., PERLMUTTER, H., DAVIES, H:
Preparative flat-bed electrofocusing in a granulated
gel with the LKB 2117 Multiphor, Application Note 198,
(1975), Fa. LKB
286. WORWOOD, M., AHERNE, W., DAWKINS, S., JACOBS, A:
The characteristics of ferritin from human tissues,
serum and blood cells.
Clin. Sci. Mol. Med. 48: 441- 451 (1975)
287. WORWOOD, M., DAWKINS, S., WAGSTAFF, M., JACOBS, A:
The purification and properties of ferritin from human
serum.
Biochem. J. 157: 97-103 (1976)
288. WORWOOD, M., CRAGG, S.J., WAGSTAFF, M., JACOBS, A:
Binding of human serum ferritin to concanavalin-A.
Clin. Sci. 56: 83-87 (1979)
289. WORWOOD, M., CRAGG, S.J., WILLIAMS, A.M., WAGSTAFF,
M., JACOBS, A:
The clearance of ^{131}I -Human plasma ferritin in man.
Blood 60: 827-833 (1982)

290. Worwood, M:
Ferritin in human tissues and serum.
Clinics in Haematology 11: 275-307 (1982)
291. WORWOOD, M., BROOK, J.D., CRAGG, S.J., HELLKUHL, B:
Assignement of human ferritin genes to chromosomes 11
and 19q 13.3- 19qter
Hum. Genet. 69: 371-374 (1985)
292. WORWOOD, M:
Serum ferritin.
Clin. Sci 70: 215-220 (1986)
293. WUSTEFELD, C., CRICHTON, R.R:
The amino acid sequence of human spleen apoferritin.
FEBS LETT. 150: 43-48 (1982)
294. YASUHIRO, Y., TSUKASA, A:
Acute monocytic leukaemia cell isoferferritin.
Cancer 46: 289-292 (1980)
295. YOSHINO, Y., HIRAI, Y., AOKI, T., MORITA, T., EGUCHI,
Y., YAJIMA, T., KAGAWA, Y:
Serum ferritin concentration and isoferferritin patterns
detected by immunoradiometric assay.
J. Nutr. Sci. Vitaminol. 26: 87 (1980)
296. ZÄHRINGER, J., BALIGA, B.S., MUNRO, H.N:
Novel mechanism for translational control in regula-
tion of ferritin synthesis by iron.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 857.861 (1976)
297. ZAVAGNO, G., NITTI, D., MARCHET, A., MOSCHUI, N.,
BELLUCO, C., DE MARCHI, F., SERAFINI, F., LISE, M:
Significance of serum ferritin in patients with gastric
and colorectal cancer.
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 23(7): 1077-1p78 (1987)
298. ZUYDERHOUDT, F.M.J., BEORS, W., LINTHORST, C., JORNING,
G.G.A., HENGVELD, P:
An enzyme linked immunoassay for ferritin in human se-
rum and rat plasma and the influence of the iron in
serum ferritin on serum iron measurement during acute
hepatitis.
Clin. Chim. Acta 88: 37-44 (1978)
299. ZUYDERHOUDT, F.M.J., SINDROM, J.W., MARX, J.J.M.,
JÖRNING, G.G.A., GOOL, J:
The amounts of ferritin and hemosiderin in the livers
of patients with iron loading diseases.
Hepatology 3(2): 232.235 (1983)

Als Verfasser bedanke ich mich bei allen Personen und Institutionen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Das Thema für die vorliegende Arbeit wurde mir von Herrn Prof. Dr. med. Rolf Lamerz, Oberarzt der medizinischen Klinik II am Universitätsklinikum Großhadern in München gestellt. Für sein gleichbleibend großes persönliches Engagement für fachliche Probleme wie auch in menschlicher Hinsicht und für seine stete Bereitschaft zur kritischen wissenschaftlichen Diskussion möchte ich mich besonders bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. G. Paumgartner, Direktor der medizinischen Klinik II am Klinikum Großhadern, für die Möglichkeit der wissenschaftlichen Arbeit an seinem Institut.

Für die Überlassung von menschlichem Extraktionsmaterial gebührt mein Dank außerdem Herrn Prof. Dr. med. Eder, Direktor des Pathologischen Instituts der Universität München.

Für die freundliche Zusendung eines monoklonalen Antikörpers gegen menschliches Herzferritin danke ich Herrn Dr. med.

P. Arosio (Istituto Science Biomediche, Ospedale San Raffaele, Milano, Italy), für die Zusendung eines polyklonalen

Antiserums gegen menschliches Herzferritin Herrn Dr. med.

M. Worwood (Department of Haematology, University of Wales, Cardiff).

Für wertvolle methodische Hinweise und Unterstützung bin ich Herrn G. Spöttl, chemisch-technischer Assistent an der medizinischen Klinik II im Klinikum Großhadern, für engagierte Hilfe bei der Durchführung radioimmunologischer Bestimmungen Frau A. Brandt, medizinisch technische Assistentin der Klinik, zu besonderem Dank verpflichtet.

L E B E N S L A U F

1. Dezember 1961

geboren in Ingolstadt

Schulbildung

1969 - 1972

Volksschule St. Anton, Ingolstadt

1972 - 1981

Katharinen-Gymnasium, Ingolstadt

1981

Abitur

Studium

1981 - 1987

Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilian-Universität München

1981 - 1987

Stipendium nach dem Bayer. Begabtenförderungsgesetz

Praktisches Jahr in folgenden Kliniken:

- Chirurgische Klinik, Klinikum Großhadern München
- Medizinische Klinik I, Klinikum Großhadern
- Neurologische Klinik, Klinikum Großhadern

28. Okt./ 25. Nov.
1987

Drittes Staatsexamen

Dissertation

Jan. 1985 -
Jan. 1988

Experimentelle Arbeit an der Medizinischen Klinik II im Klinikum Großhadern, München

